

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Eliška Bubáková

Klinická klasifikace sekvenčních variant v nekódujících regulačních oblastech genů predisponujících ke vzniku karcinomu prsu

Clinical classification of sequence variants in non-coding regulatory regions in breast cancer susceptibility genes.

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Jan Ševčík, Ph.D.

1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha
Ústav biochemie a experimentální onkologie

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.8. 2019

Podpis

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Janu Ševčíkovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a velmi přátelský přístup při vypracovávání diplomové práce. Také bych ráda poděkovala dalším pracovníkům Laboratoře onkogenetiky 1. LF UK za pomoc a za vytvoření přátelského pracovního prostředí.

Abstrakt

Inaktivace tumor supresorového genu *BRCA1* příčinou vysokého celoživotního rizika vzniku karcinomu prsu a dalších malignit. Plošný genetický skrínig indikovaných jedinců z vysoce rizikových rodin dovoluje identifikovat množství sekvenčních variant v dosud známých predispozičních genech. Většina nově nalezených variant dosud nemá jasný klinický význam a představuje tak z hlediska diagnostiky závažný problém. Část těchto variant se nachází i v nekódujících regulačních oblastech genů. Součástí procesu klinické klasifikace variant je jejich funkční charakterizace. Cílem této práce bylo vytvořit modelový systém pro funkční charakterizaci variant v nekódujících oblastech a následně ověřit jeho funkčnost. Modelový systém byl založen na cílené genové manipulaci pomocí ko-transfekce CRISPR-Cas9 a donorového konstruktů s částí sekvence genu *BRCA1*, ve které byly zavedeny analyzované modifikace, do U2 OS buněk. Tyto buňky v sobě mají stabilně vložený DR-GFP systém dovolující stanovit aktivitu homologní rekombinace (HR). Do U2 OS buněk se nakonec podařilo zavést monoalelické modifikace. Tyto modifikace se nacházely v oblasti sekvence Kozakové genu *BRCA1*. Nejdříve byla pomocí qRT-PCR stanovena exprese na úrovni mRNA *BRCA1*, která byla u všech buněk s analyzovanými alteracemi stejná. Dále byla stanovena exprese na úrovni proteinu pomocí metody ELISA. Bylo zjištěno, že některé z analyzovaných alterací významně snižují v buňkách modelového systému koncentraci BRCA1 proteinu. Dále byla u stabilních klonů pomocí DR-GFP eseje stanovena aktivita HR, ve které BRCA1 participuje, a lze předpokládat, že snížená aktivita tohoto mechanismu může vyvolávat maligní transformaci. Bylo zjištěno, že aktivita HR pozitivně koreluje s koncentrací proteinu BRCA1 a u variant negativně ovlivňujících expresi na úrovni proteinu je významně snížena. Byla tak ověřena funkčnost modelového systému. Bylo potvrzeno, že snížené množství proteinu BRCA1 má za následek nižší aktivitu HR a že alterace v nekódujících regulačních oblastech genu *BRCA1* mohou negativně ovlivňovat biologickou aktivitu produktu genové exprese *BRCA1* a přispívat tak k riziku vzniku nádorového onemocnění prsní žlázy.

Klíčová slova: BRCA1, hereditární karcinom prsu, klinická klasifikace, homologní rekombinace, nekódující oblasti

Abstract

Inactivation of tumor suppressor gene *BRCA1* causes a life-long risk of breast carcinoma development. Genetic screenings of indicated individuals from high-risk families help to identify large number of sequence variants in known predisposing genes. Majority of discovered variants doesn't have clinical significance yet which causes a big problem for diagnostics. Some of these variants are found within regulatory non-coding regions of gene. A part of the clinical classification of variants is their functional characterization. The goal of this thesis was to create a model system for functional characterization of variants in non-coding regions and to verify its function. Model system was based on targeted gene manipulation by co-transfecting CRISPR-Cas9 construct and donor construct that contained a portion of *BRCA1* gene sequence with analyzed modifications, into U2 OS cells. The cells have stably integrated DR-GFP system which allows the activity of homologous recombination (HR) to be determined. Monoallelic modifications were induced into U2 OS cells. These modifications were in a Kozak sequence region of *BRCA1* gene. Expression level of *BRCA1* mRNA was determined by qRT-PCR, which showed the same levels of mRNA in all cells with analyzed alterations. Next, expression level of BRCA1 protein was determined by ELISA method. It showed that some of the analyzed alterations had significantly reduced level of BRCA1 protein. Next the activity of HR was determined by DR-GFP assay. BRCA1 participates in HR, and it's assumed that the reduced activity of this mechanism might cause a malignant transformation. It was found that the activity of HR positively correlates with the concentration of BRCA1 protein. Variants with negative effect on protein expression had significantly reduced HR. This way the functionality of model system was verified. It was also confirmed that reduced levels of BRCA1 cause a reduced activity of HR and that alterations in non-coding regulatory sequences of *BRCA1* gene can negatively affect biological activity of the gene expression product which might contribute to the risk of tumorigenesis in mammary gland.

Keywords: BRCA1, hereditary breast cancer, clinical classification, homologous recombination, non-coding regions

Obsah

Poděkování	1
Abstrakt.....	2
Abstract.....	3
Seznam zkratek.....	6
1. Teoretický úvod.....	8
1.1 Hereditární karcinom prsu	8
1.2 BRCA1.....	10
1.2.1 Struktura genu.....	10
1.2.2 Struktura proteinu	11
1.2.3 Funkce BRCA1.....	14
1.2.4 Další funkce proteinu BRCA1.....	19
1.2.5 Komplexy BRCA1	20
1.2.6 Regulace exprese genu <i>BRCA1</i>	22
2. Cíle práce.....	29
3. Metody.....	31
3.1. Konstrukce CRISPR-Cas9 vektoru pro modifikaci 5' UTR genu <i>BRCA1</i>	31
3.1.1. Navržení sgRNA.....	32
3.1.2. Příprava expresního vektoru px330.....	33
3.1.3. Transformace plazmidů do kompetentních buněk.....	34
3.1.4. Izolace plazmidové DNA	35
3.1.5. Sekvenování.....	36
3.1.6. Stanovení koncentrace nukleových kyselin.....	37
3.2. Příprava donorové DNA	37
3.2.1. PCR amplifikace.....	38
3.2.2. Klonování do vektoru („ <i>STRATA clone systém</i> “)	39
3.2.3. Site-directed mutagenese.....	39
3.3. Tkáňové kultury	42
3.3.1. U2 OS buňky	42
3.3.2. Kultivace buněk	42
3.3.3. Pasážování buněk	42
3.4. Příprava klonů se stabilně modifikovaným <i>BRCA1</i>	42

3.4.1.	Transfekce	43
3.4.2.	Ověření funkčnosti navrženého systému	44
3.4.3.	Selekce klonů se stabilně zavedenými alteracemi	46
3.5.	Kvantifikace BRCA1 na úrovni mRNA	47
3.5.1.	Izolace RNA	47
3.5.2.	Stanovení množství RNA	47
3.5.3.	Příprava cDNA	47
3.6.	Stanovení množství proteinu BRCA1	48
3.6.1.	Izolace proteinu	48
3.6.2.	Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA	49
3.6.3.	ELISA	49
3.7.	Analýza aktivity homologní rekombinace pomocí „DR-GFP assay“... 50	
3.7.1.	Příprava buněk pro „DR-GFP assay“	51
3.7.2.	Analýza „DR-GFP assay“	52
4.	Výsledky	53
4.1.	Konstrukce modelového systému pro funkční <i>in vitro</i> evaluaci studovaných sekvenčních alterací	53
4.1.1.	Příprava systému pro cílenou genovou manipulaci	53
4.1.2.	Izolace klonů U2 OS se stabilně cíleně modifikovaným genomem	57
4.2.	Funkční charakterizace izolovaných variant	62
4.2.1.	Stanovení množství mRNA	62
4.2.2.	Stanovení množství proteinu BRCA1	63
4.2.3.	Stanovení aktivity homologní rekombinace	65
5.	Diskuze	67
6.	Závěr	76
	Seznam obrázků	77
	Seznam tabulek	77
	Seznam použité literatury	78

Seznam zkratek

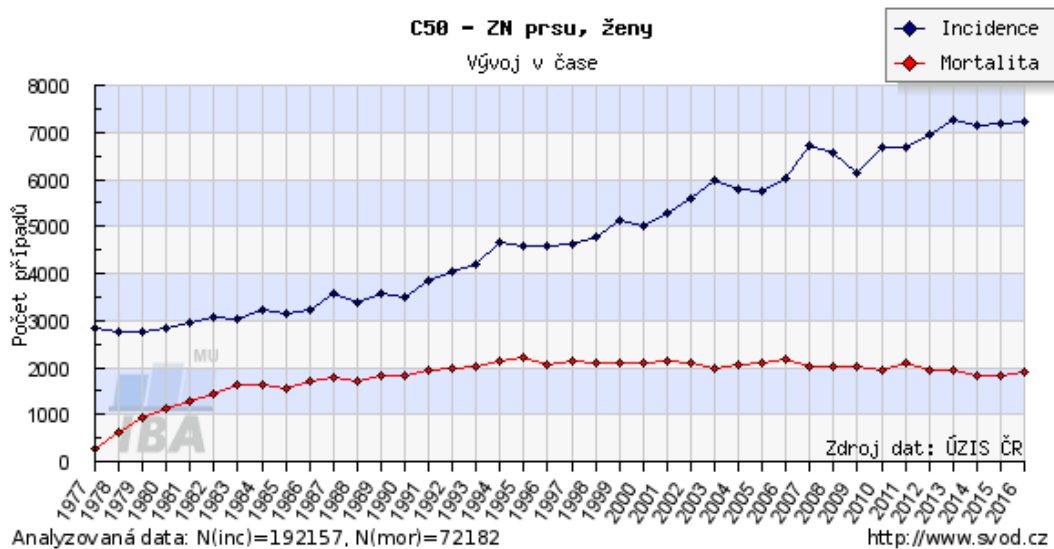
Zkratka	Celý název	Český název (používá-li se)
3' UTR	3' untranslated region	3' nepřekládaná oblast
5' UTR	5' untranslated region	5' nepřekládaná oblast
53BP1	p53 binding protein 1	
AhR	Aryl hydrocarbon receptor	
AP-1	Activator protein 1	
ATF-1	Activating Transcription Factor 1	
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated gene	
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosin trifosfát
ATR	Ataxia-telangiectasia and Rad3-related	
AURKA	Aurora kinase A	
B2M	β 2-microglobulin	
BACH1	Basic leucine zipper transcription factor	
BARD1	BRCA1-associated ring domain 1	
BCA	Bicinchoninic acid	Bicinchoniniková kyselina
BIR	Break induced replication	
BLM	Bloom syndrome (protein)	
bp	Base pairs	Páry bazí
BRCA1	Breast Cancer 1	
BRCC36/45	BRCA1/BRCA2-containing complex subunit36/45	
BRCT	BRCA1 C-terminal (domain)	
BRN-3b	Brain-specific homeobox 3b	
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	Cyklin dependentní kináza 2
c-myc	Cellular-myelocytomatosis	
CRE	cAMP response elements	
CREB	cAMP response element-binding protein	
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	
CtBP	carboxyl-terminal binding protein	
CtIP	C-terminal interaction protein	
DNA2		
DNA-PKcs	Protein kinase DNA-activated catalytic subunit	Katalytická podjednotka DNA-protein kinázy
DR-GFP	Direct repeat – green fluorescent protein	
DSB	Double strand break	Dvouřetězcový zlom
E2F	E2 Transcription Factor	
EDTA	Ethylendiamine tetraacetate	kyselina ethylendiamintetraoctová
ERBB2/HER-2	Erythroblastic oncogene B/ human epidermal growth factor receptor 2	
ERα	Estrogen receptor α	Estrogenový receptor α
EXD2	Exonuclease 3'-5' Domain Containing 2	
EXO1	exonuclease 1	Exonukleáza 1
GABPα/β	GA-binding protein	
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase	Glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
gDNA	Genome DNA	Genomová DNA
GFP	Green fluorescent protein	Zelený fluorescenční protein
H2AX	H2A histone family member X	
HDAC	Histone deacetylase	Histon deacetyláza

HR	Homologous recombination	Homologní rekombinace
CHEK2	checkpoint kinase 2	
ID4	Inhibitor of differentiation 4	
IR	Ionizing radiation	Ionizační záření
kbp	kilobase pairs	Páry kilobází
LBA	Luria-Bertani agar	
LBM	Luria-Bertani medium	
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1	
miRNA	Micro RNA	
MRE11	Meiotic recombination 11	
MRN	MRE11-RAD50-NBS1 complex	
mRNA	Messenger DNA	
NAD/NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide	Nikotinamid adenin dinukleotid
NBA1	New component of the BRCA1 A complex	
NBR2	neighbor of BRCA1 gene 2	
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1	
NES	Nuclear export signal	Jaderný exportní signál
NHEJ	Non-homologous end joining	Nehomologní spojení konců
NLS	Nuclear localization sequence	Jaderná lokalizační sekvence
PALB2	Partner and localizer of BRCA2	
PAM	Protospacer adjacent motif	
PCR	Polymerase chain reaction	
PNK	Polynukleotid kinase	Polynukleotid kináza
POU	Pit-1, Oct-1, Unc-86	
PTIP	PAX transcription-activation domain-interacting protein	
qRT-PCR	Quantitive PCR with reverse transcription	Kvantitativní PCR s reverzní transkripcí
RAP80	Receptor-associated protein 80	
RIF1	Rap1-interacting factor 1	
RING	Really interesting new gene (domain)	
RPA	Replication protein A	
RT-qPCR	Quantitative real-time PCR	
SCD	Serine cluster domain	
SDSA	Synthesis-dependent strand annealing	
sgRNA	Single guide RNA	
SP1	specificity protein 1	
SRC-1	steroid receptor coactivator 1	
SSA	Single strand annealing	
ssDNA	Single stranded DNA	Jednořetězcová DNA
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin
VUS	Variant of unknown significance	Varianta s nejasným vlivem
wt	Wild type	
XLF	XRRC4 like factor	
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4	

1. Teoretický úvod

1.1 Hereditární karcinom prsu

Karcinom prsu je nejčastějším nádorovým onemocněním u žen celosvětově s vysokou incidencí i mortalitou (Bray *et al.* 2018). Od doby zavedení plošného vyšetření v České republice bylo zjištěno, že incidence tohoto onemocnění se neustále zvyšuje, zatímco jeho mortalita je v posledním desetiletí ustálena (**Obr. 1**).



Obrázek 1: Časový vývoj incidence a mortality zhoubného novotvaru karcinomu prsu (C-50) v české populaci. Červeně je vyznačena úmrtnost, která se drží na přibližně stejné úrovni již zhruba 30 let, což je způsobeno zlepšující se zdravotní péčí. Modře je vyznačena incidence, tedy počet diagnostikovaných případů, který roste, a to zejména kvůli zlepšujícím se diagnostickým metodám.

Karcinomy prsu se vyskytují převážně ve sporadické formě (90-95 %), která není vyvolaná vrozenou genetickou mutací. Dědičné, tzv. hereditární formě onemocnění, je přisuzováno pouze 5-10 % případů všech karcinomů prsu (Easton a Peto 1990). Ačkoliv je hereditární forma méně častým typem onemocnění, je klinicky významná, neboť se toto onemocnění projevuje těžším průběhem, nižším věkem pacientek v době první diagnózy, predispozicí k dalším malignitám, kterými jsou například karcinomy vaječníku (Miki *et al.* 1994), opakujícími se karcinomy a bilaterálními nálezy (Claus *et al.* 1994).

Hereditární forma karcinomu prsu vykazuje silné známky Mendelovské dědičnosti a na základě sledování výskytu onemocnění u postižených rodin byl pozičním

mapováním objeven hlavní predispoziční gen *BRCA1* (Breast Cancer gene 1); *OMIM* * 113705 (Miki *et al.* 1994) a následoval objev *BRCA2* (Breast cancer gene 2); *OMIM* * 600185 (Hamajima *et al.* 2002). V české populaci je zhruba jedna čtvrtina všech případů hereditární formy karcinomu prsu způsobena inaktivací jednoho z těchto dvou tumor supresorových genů (Pohlreich *et al.* 2003).

Následná snaha o identifikaci dalších genetických faktorů vedla postupně k objevu dalších predispozičních genů se střední – *PALB2* (Partner and localizer of BRCA2) (Rahman *et al.* 2007), *ATM* (ataxia-telangiectasia mutated gene) (Thompson *et al.* 2005), *CHEK2* (checkpoint kinase 2) (Sodha *et al.* 2002) a s nízkou penetrancí (Daly *et al.* 2016). I přesto však u většiny případů hereditárního karcinomu prsu nebyla dosud objevena příčinná genetická alterace, která je zodpovědná za vysoké riziko vzniku nádorového onemocnění.

Karcinomy prsu je možné, dle jejich expresních profilů a histopatologického nálezu rozdělit do několika skupin. Toto rozdělení bylo poprvé navrženo Perouem a Sorlie (Perou *et al.* 2000; Sorlie *et al.* 2001), kteří karcinomy rozdělili do skupin: (1) Luminal-like A, (2) Luminal B, (3) Basal-like, (4) ERBB2-positive, (5) Normal-like. Tyto skupiny odrážejí vztahy mezi expresními profily karcinomů a souvisí s šancí na přežití u jimi postižených pacientů. Statisticky nejhorší prognózu mají pacienti postižení karcinomem prsu typu ERBB-2 (Erythroblastic oncogene B, jinak označovaný též HER-2, human epidermal growth factor receptor 2) positive a následně pacienti s typem basal-like. Naopak nejlepší prognózu mají pacienti s karcinomem prsu typu luminal A (Sorlie *et al.* 2001; Sorlie *et al.* 2003).

Karcinomy prsu, které jsou typické pro nosiče mutací v genu *BRCA1*, se často (ne však vždy) vyznačují tím, že jsou typu basal-like (Sorlie *et al.* 2003; Foulkes *et al.* 2004) a zároveň triple-negativní - buňky nádoru neexprimují estrogenové a progesteronové receptory a HER-2, (Domagala *et al.* 2017). Basal-like karcinomy jsou morfologicky heterogenní skupinou tumorů, ve které však z histologického hlediska převažují duktální/NOS (not otherwise specified) karcinomy grade 3. Grade 3 znamená málo diferencovaný nádor. Dále mají často, na rozdíl od ostatních typů tumorů, metaplastické vlastnosti a vysoký mitotický index (Livasy *et al.* 2006). Pro typ basal-like tumory prsu je také charakteristický nižší průměrný věk pacientů době první diagnózy v porovnání s ostatními typy tumorů prsu a vyšší výskyt mutace v tumor supresoru *P53* (Calza *et al.*

2006). Ač je název skupiny basal-like trochu zavádějící a napovídá by jinému závěru, tento typ tumorů má původ v ER α (estrogenový receptor α) negativních progenitorech luminálních buněk (Molyneux *et al.* 2010). Riziko, že se u nosičů patogenní mutace v genu *BRCA1* vyvine tumor prsu do 40-ti let, je až 19 % a riziko vzniku tumoru ovarií se u stejně starých nosičů uvádí 6 %. U nosičů do 70-ti let se karcinom prsu vyvine s pravděpodobností 85 % karcinom vaječníků až z 63 % (Easton *et al.* 1995; Ford *et al.* 1998).

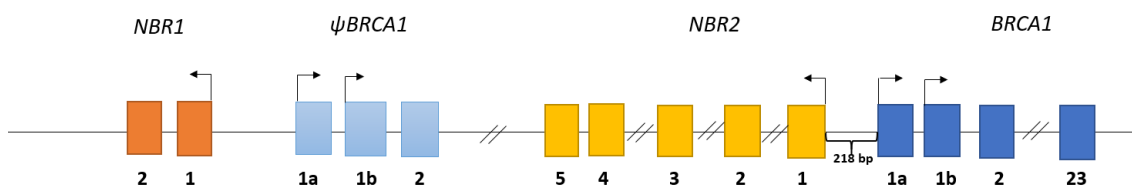
1.2 BRCA1

1.2.1 Struktura genu

Gen *BRCA1*, jehož mutace byly spojeny s dědičnou formou rakoviny prsu u žen, byl poprvé lokalizován v roce 1990 (Hall *et al.* 1990) a identifikován byl roku 1994 (Miki *et al.* 1994). Gen *BRCA1* leží na chromozomu 17q21 (Hall *et al.* 1990) a nachází se na místě chr17:43 044 295-43 125 483. Jeho primární transkript je dlouhý 81 189 bp (párů bází) a je složen ze 24 exonů, z nichž je 22 kódujících. Iniciační kodón leží až na exonu 2 a exony 1a a 1b jsou nekódující. Nejdelším exonem je exon 11, který zabírá až 60 % kódující sekvence (UCSC).

BRCA1 má dvě hlavní transkripční varianty označované jako *BRCA1a* a *BRCA1b*, které se liší typem exonů 1. Transkripční varianta *BRCA1a* o délce 121 bp obsahuje nekódující exon 1a a transkripční varianta *BRCA1b* obsahuje nekódující exon 1b. Transkripční varianta *BRCA1a* je produkována převážně v prsní tkáni, zatímco transkripční varianta *BRCA1b* převažuje v tkáni placenty. *BRCA1a* a *BRCA1b* mají odlišný promotor. Varianta *BRCA1a* je regulována promotorem α , zatímco varianta *BRCA1b* je regulována promotorem β . Promotor α je obousměrný a reguluje kromě *BRCA1a* také opačně orientovaný gen *NBR2* (neighbor of BRCA1 gene 2) (Xu *et al.* 1995; Xu *et al.* 1997; Sobczak a Krzyzosiak 2002), který se nachází 218 bp upstream od transkripčního počátku exonu 1a *BRCA1* (Griffiths *et al.* 1997). Upstream od *NBR2* leží tandemová duplikace, pseudogen genu *BRCA1*, který je označován jako ψ *BRCA1*. Tento pseudogen také obsahuje exony 1a, 1b a 2 s přilehlými nekódujícími sekvencemi a od genu *BRCA1* je vzdálen 30 kbp (**Obř. 2**) (Brown *et al.* 1996). Promotor genu *BRCA1*, α

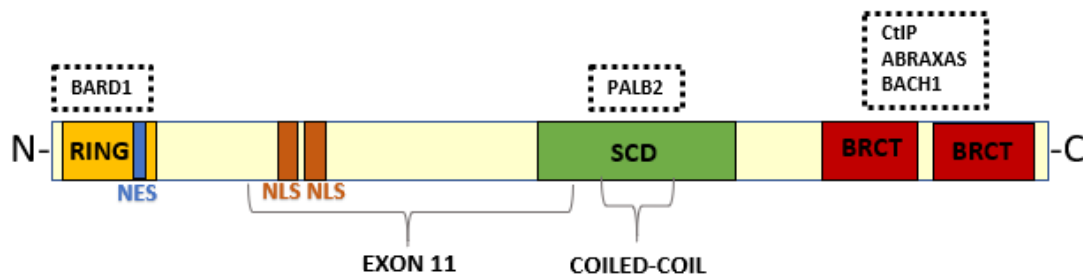
a promotor α genu $\psi BRCA1$, mají až 84 % identitu (Pettigrew *et al.* 2010). $\psi BRCA1$ sousedí s opačně orientovaným genem $NBR1$ (Brown *et al.* 1996; Dimitrov *et al.* 2001).



Obrázek 2: Grafické schématické znázornění oblasti chromosomu 17 v blízkosti genu $BRCA1$. Exony $BRCA1$ jsou znázorněny tmavomodře. Exony 1a a 1b jsou nekódující a translace je započata až v oblasti exonu 2. Exon 1a je regulován promotorem α , exon 1b je regulován promotorem β . Promotor α je obousměrný a kromě $BRCA1$ reguluje také sousední gen $NBR2$, který se nachází pouze 218 bp od počátku transkripce exonu 1a a který je transkribován opačným směrem (exony $NBR2$ jsou vyznačeny žlutými obdélníky). Upstream od genu $NBR2$ je lokalizován pseudogen $\psi BRCA1$, který obsahuje pouze exon 1a, 1b a 2 (světlemodré obdélníky). Upstream od $\psi BRCA1$ leží gen $NBR1$ (jeho exony jsou vyznačeny oranžovými obdélníky). Šipky označují směry transkripce jednotlivých genů.

1.2.2 Struktura proteinu

$BRCA1$ je fosfoprotein skládající se z několika funkčních a interakčních domén. Hlavní proteinový produkt genu $BRCA1$ obsahuje 1863 aminokyselin (Miki *et al.* 1994) a je veliký 220 kDa (Chen, Farmer, *et al.* 1996). Mezi domény proteinu $BRCA1$ patří RING (really interesting new gene) doména na N-konci proteinu, SCD (serine cluster domain) a dvě BRCT ($BRCA1$ terminal domains) domény na C-konci. Mimo to obsahuje $BRCA1$ interakční coiled-coil doménu, NES (nukleární exportní signál) a dva NLS (nukleární lokalizační signály) (**Obr. 3**).



Obrázek 3: Struktura proteinu BRCA1 a jeho hlavní interakční partneři. Protein se sestává z funkčních domén (RING, SCD, BRCT), které jsou znázorněny jako barevné obdélníky s popisem. Doména RING (vyznačena **žlutě**) se nachází se na aminokyselinách 15-109. Jedná se o protein-interakční doménu, pomocí které BRCA1 vytváří stabilní heterodimerní komplex se svým hlavním vazebným partnerem BARD1. V doméně RING se zároveň nachází nukleární exportní signál (NES) - vyznačen **modrou** barvou. Dva nukleární lokalizační signály (NLS) (vyznačeny **oranžovou** barvou) se nachází se na aminokyselinách 503-508 a 606-615. NLS se nachází v oblasti, která je kódována exonem 11. Regulační doména SCD se nachází na aminokyselinách 1280-1524). Součástí SCD je oblast interakčního motivu coiled-coil (aminokyseliny 1391-1424), který zprostředkovává vazbu s PALB2 při homologní rekombinaci. Dvě fosfoprotein interakční BRCT domény leží tandemově za sebou. Nad příslušnými doménami jsou v přerušovaném rámečku vyznačeni jejich nejvýznamnější vazební partneři.

1.2.2.1 RING doména

RING doména se nachází blízko N-konce BRCA1 proteinu v oblasti aminokyselin 15-109 a její součástí je také motiv RING. Tento motiv se vyznačuje konzervovaným strukturním motivem aminokyselin, jehož primární aminokyselinová sekvence je cystein 3 - histidin – cystein 4, který je jedním z typů motivů zinkového prstu. Do těchto motivů se váží atomy Zn^{2+} , které stabilizují sekundární strukturu domény (Lovering *et al.* 1993; Miki *et al.* 1994; Meza *et al.* 1999). RING doména proteinu BRCA1 obsahuje tři α -šroubovice a tři řetězce, které jsou vůči sobě antiparalelní a tvoří strukturu β -skládaného listu. V motivu RING se nachází pouze centrální α -šroubovice, β -skládaný list a dvě smyčky vážící dva atomy Zn^{2+} (Bienstock *et al.* 1996; Brzovic *et al.* 2001). Nedaleko domény RING se nachází jaderná exportní sekvence NES nacházející se na aminokyselinách 81-99. Tato sekvence slouží pro export proteinu BRCA1 z jádra do cytoplazmy (Rodriguez a Henderson 2000).

BRCA1 může skrze RING doménu přímo interagovat s RING doménou proteinu BARD1 (BRCA1-associated ring domain 1), který je jeho hlavním vazebným partnerem (Wu *et al.* 1996). Výsledkem je stabilizovaný heterodimér BRCA1-BARD1, který

vykazuje E3 ubikvitin-ligázovou aktivitu. BRCA1 i BARD1 v monomerní formě tuto aktivitu *in vitro* vykazují, ale jen na velice nízké úrovni (Meza *et al.* 1999; Hashizume *et al.* 2001).

Ačkoliv je BRCA1 převážně jaderný protein (Ruffner a Verma 1997), v oblasti RING domény se na místech 81-99 nachází aktivní NES, která umožňuje proteinu BRCA1 putovat do cytoplazmy (Rodriguez a Henderson 2000). V případě interakce BRCA1 s BARD1 je však tato sekvence skryta a komplex BRCA1-BARD1 neputuje ven z jádra (Fabbro *et al.* 2002).

1.2.2.2 Nukleární lokalizační signály

V oblasti, který kóduje exon 11, leží nedaleko od sebe dva NLS, které zajišťují transport proteinu BRCA1 do jádra. Tyto NLS jsou rozeznávány importinem α a nachází se na místech aminokyselin 503-508 a 606-615. (Chen, Li, *et al.* 1996).

1.2.2.3 Serine cluster domain

SCD je regulační oblast proteinu BRCA1, která se nalézá na aminokyselinách 1280-1524. V této doméně se nachází 10 serinových zbytků, které jsou cílem fosforylace řady signalizačních protein kináz (ATM, ATR, DNA-PK, AURKA), které hrají centrální úlohy v procesu odpovědi buňky na poškození DNA (Cortez *et al.* 1999; Gatei *et al.* 2001). Například fosforylace serinu 1387 byla popsána v přímé souvislosti s aktivací G1/S kontrolního bodu buněčného cyklu, zatímco fosforylace serinu 1423 je nutná pro kontrolní bod v G2 fázi (Xu *et al.* 2002).

Uvnitř této domény se na aminokyselinách 1391-1424 vyskytuje další protein interakční doména „coiled-coil.“ Pomocí této domény BRCA1 přímo interaguje s proteinem PALB2 při opravách DNA homologní rekombinací (HR) (Crick 1952; Hu *et al.* 2000; Sy *et al.* 2009).

1.2.2.4 BRCT domény

Na C-konci BRCA1 proteinu se nachází dvě identické tandemově umístěné BRCT domény. Jde o konzervovanou strukturu, kterou lze najít také u jiných proteinů podílejících se na opravě DNA, například u 53BP1 (p53 binding protein 1) (Iwabuchi *et al.* 1994; Koonin *et al.* 1996). BRCT je protein interakční doména, která umožňuje BRCA1 interagovat s proteiny BACH1 (Basic leucine zipper transcription factor) (Cantor *et al.* 2001), CtIP (C-terminal interaction protein) (Yu *et al.* 1998) a s proteinem ABRAXAS (Wang, Matsuoka, *et al.* 2007). BRCT je fosfospecifická doména, která interaguje s aminokyselinovým motivem interakčního partnera pSerin-X-X-Fenylalanin, kdy „p“ značí fosforylovaný serin a X jakoukoliv aminokyselinu (Williams *et al.* 2004). Každá z BRCT domén proteinu BRCA1 je složena ze čtyř paralelních vláken, která tvoří centrální β -list, a ze tří okolních α -helixů. Dvě BRCT domény spojuje oblast dlouhá 23 aminokyselin (Williams *et al.* 2001).

1.2.3 Funkce BRCA1

BRCA1 je jaderný multifunkční fosfoprotein jehož biologická aktivita se může lišit v závislosti na typu vazebného partnera, se kterým BRCA1 interaguje pomocí svých protein-interakčních domén. Jeho nejvíce prozkoumanou funkcí je přímá participace při opravě dvouřetězcových zlomů DNA procesem homologní rekombinace. Další z jeho funkcí je E3-ubikvitin-ligázová aktivita, a také se podílí na dalších buněčných procesech – regulace buněčného cyklu, transkripce aj.

1.2.3.1 Udržování genomové integrity

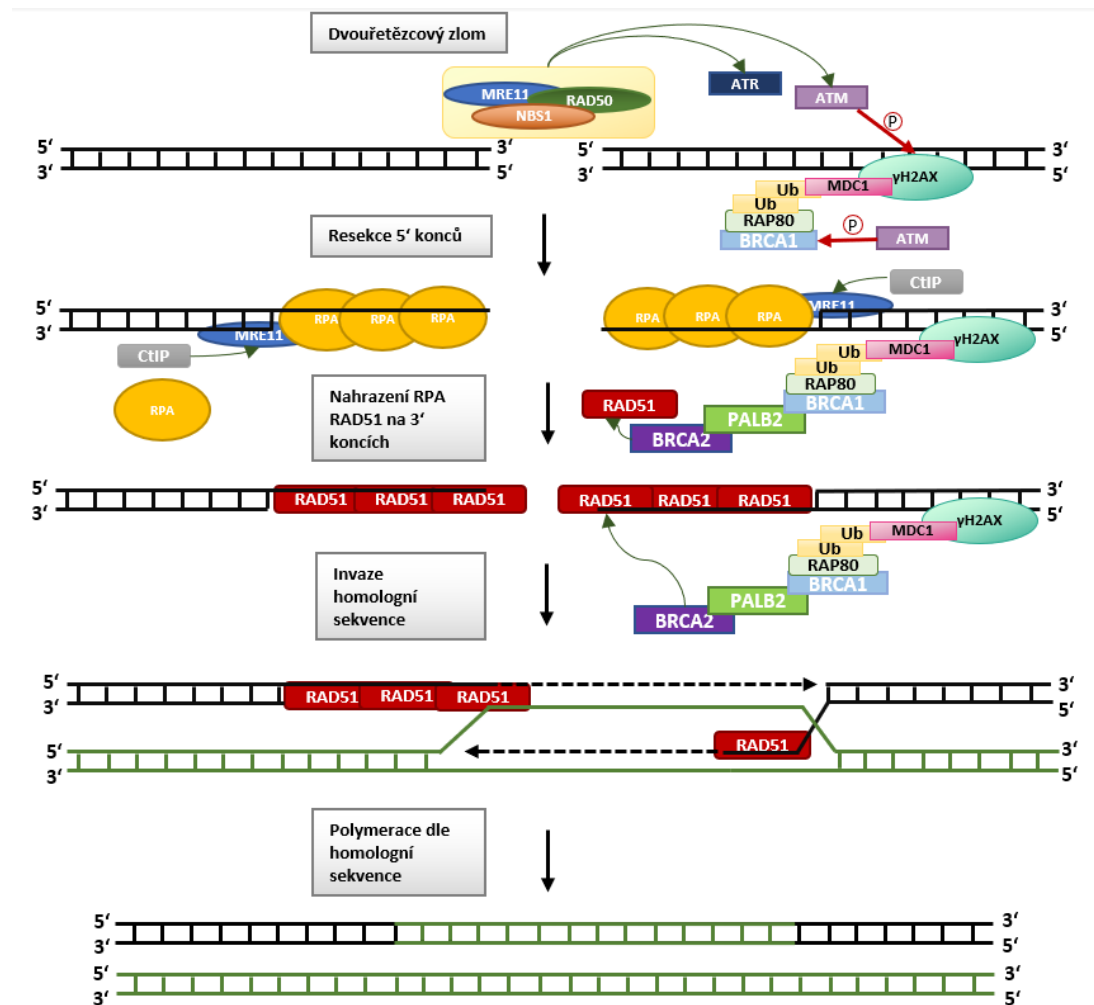
Genomová integrita může být narušena faktory endogenními, tedy faktory, jejichž zdrojem je buňka samotná, či faktory exogenními, které pochází z vnějšího prostředí. Mutageny se mohou dělit na fyzikální, chemické a biologické a mohou indukovat různé typy mutací DNA, například jednořetězcové zlomy (SSB, Single strand breaks) a dvouřetězcové zlomy (DSB, Double strand breaks), chybné zařazení báze atd. Aby byly buňky schopné udržovat svou genomovou integritu, potřebují různé mechanismy, kterými jsou indukované mutace opravovány. Bez opravy mutace může dojít k maligní transformaci buněk (Waters 2006).

Protein BRCA1 je protein účastnící se udržování genomové integrity, a to v případě oprav dvouřetězcových zlomů DNA. DSB mohou být indukovány buňkou samotnou, například při replikaci po kolapsu replikační vidlice, která narazila na lézi DNA, nebo SSB (Ryan *et al.* 1991), či vnějšími faktory, mezi které patří například ionizační záření (IR) (Hagen 1989).

Mechanismy, kterými mohou být dvouřetězcové zlomy DNA opravovány, jsou především HR (homologní rekombinace) a C-NHEJ (canonical non-homologous end joining). Dalšími mechanismy oprav DSB DNA jsou Alt-NHEJ (alternative non-homologous end joining) (Corneo *et al.* 2007), SSA (single strand annealing) (Lin *et al.* 1984), SDSA (synthesis dependent strand annealing) (Nassif *et al.* 1994) a BIR (break induced replication) (Malkova *et al.* 1996). Protein BRCA1 se účastní dvou hlavních mechanismů oprav, HR a C-NHEJ a také se účastní rozhodování o mechanismu opravy. Zatímco oprava DSB pomocí HR převažuje v pozdní S a v G2 fázi buněčného cyklu, C-NHEJ převažuje v G1 a M fázi buněčného cyklu (Takata *et al.* 1998).

1.2.3.1.1 Detekce poškození dvouřetězcových DNA zlomů při opravách HR

Poté, co dojde ke dvouřetězcovému zlomu DNA, je vyvolána komplexní odpověď v podobě složité kaskády proteinů (**Obr. 4**). Dvouřetězcové poškození DNA nejdříve detekováno pomocí heterotrimerního MRN komplexu (MRE11, RAD50 a NBS1) (Mirzoeva a Petrini 2001), který se váže na poškozené místo (de Jager *et al.* 2001) a přivádí k poškozenému místu serin/threoninové kinázy ATM (Lee a Paull 2005) a nepřímo ATR (Ataxia-telangiectasia and Rad3-related) (Duursma *et al.* 2013). ATM provádí po přivedení k poškozenému místu autofosforylaci serinu 1981, čímž se kináza ATM aktivuje (Berkovich *et al.* 2007). PIKK kinázy, ATM a ATR, zajišťují fosforylaci dalších proteinů participujících v detekci poškození DNA, kterými jsou například histony H2AX (H2A histone family member X), které jsou na serinu 139 fosforylovány až do vzdálenosti 1 MB od poškození DNA a které jsou po fosforylaci označovány jako γ H2AX (Rogakou *et al.* 1999). Mezi další cíle ATM a ATR patří také BRCA1, konkrétně jeho seriny v oblasti SCD (Cortez *et al.* 1999; Tibbetts *et al.* 2000). Po fosforylaci se na γ H2AX váže MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1), a to pomocí své BRCT domény (Stucki *et al.* 2005).



Obrázek 4: Grafické znázornění průběhu opravy dvouřetězcového zlomu DNA mechanismem homologní rekombinace. Dvouřetězcový zlom je nejprve identifikován senzoričným komplexem MRN (MRE11, RAD50, NBS1), který do místa zlomu přivede protein kinázy ATM a ATR. ATM následně fosforyluje histon H2AX a BRCA1, což vede k inicializaci sestavování reparačního komplexu a k zesílení iniciálního signálu o poškození DNA. MRE11, s pomocí svého kofaktoru CtIP, a další nukleázy degradují 5' volné konce a vytváří dlouhé jednořetězcové 3' přesahy nutné pro následnou invazi do sesterské chromatidy. Přesahující jednořetězcové vlákno je nejprve obsazeno proteiny RPA. Následně s pomocí BRCA1, který je u zlomu udržováno interakcí s RAP80 a MDC1 na základě ubikvitin (Ub) specifických modifikací a PALB2 s proteinem BRCA2 dojde k výměně RPA za aktivní rekombinázy RAD51. Takto vzniklá nukleoproteinová filamenta následně invadují do homologní oblasti sesterské chromatidy za vzniku D-smyčky. DNA polymerázy s využitím templátu sesterské chromatidy doplní resekovanou oblast a dojde k rozpadu D-smyčky bez „crossing overu“ a konečnému spojení konců DNA pomocí DNA ligázy.

MDC1 zajišťuje udržení BRCA1, 53BP1 a MRN v blízkosti poškození DSB (Stewart *et al.* 2003). Všechny proteiny opravného mechanismu tvoří složitý komplex označovaný jako IRIF (ionizing radiation-induced-foci). V IRIF je BRCA1 zakotven skrze interakci své BRCT domény s proteinem RAP80 (receptor-associated protein 80). RAP80 je pomocí svých dvou ubikvitin-interakčních motivů připojen k MDC1- γ H2AX skrze lysin 63 a lysin 6 ubikvitinové řetězce (Sobhian *et al.* 2007). BRCA1 v opravném komplexu díky svým interakčním doménám funguje jako lešení pro ostatní proteiny účastníci se oprav, či jejich regulace (Foray *et al.* 2003).

1.2.3.1.2 Výběr mechanismu oprav

Hlavní cesty opravující DNA DSB jsou HR a C-NHEJ. Která cesta bude nakonec zvolena je rozhodnutí, kterého se účastní řada proteinů, mezi které patří i BRCA1. Zatímco při opravě pomocí HR musí dojít k rozsáhlé resekci 5' konců, při opravě C-NHEJ musí naopak být této resekci zabráněno.

Už dávno se ví, že BRCA1 zvyšuje frekvenci homologní rekombinace a potlačuje mechanismus C-NHEJ (Moynahan *et al.* 1999; Snouwaert *et al.* 1999). K tomu dochází skrze blokaci autofosforylace DNA-PKcs (katalytická podjednotka DNA-protein kinázy), což je faktor zajišťující správný průběh C-NHEJ. Pro tuto funkci je zajišťována autofosforylace serinu na DNA-PKcs (Ding *et al.* 2003). V S fázi buněčného cyklu BRCA1 přímo interaguje pomocí své BRCT domény s regionem nedaleko serinu 2056 na DNA-PKcs, čímž je autofosforylaci zabráněno (Davis *et al.* 2014).

Dalším způsobem, kterým BRCA1 přispívá k výběru HR v S fázi buněčného cyklu, může být skrze zabránění rekrutace RIF1 (rap1-interacting factor 1), což BRCA1 zajišťuje v komplexu s CtIP. RIF1 je protein, který společně s 53BP1 zvýhodňuje opravu pomocí C-NHEJ a v G1 fázi tyto dva proteiny naopak brání rekrutaci BRCA1 k DSB (Nakamura *et al.* 2006; Escibano-Diaz *et al.* 2013). Konkrétněji, BRCA1 v S-fázi zabráňuje ATM-indukované fosforylaci proteinu 53BP1, která je pro jeho funkci a interakci s RIF1 a dalšími proteiny zvýhodňujícími C-NHEJ, nutná (Ward *et al.* 2006; Feng *et al.* 2013; Feng *et al.* 2015).

1.2.3.1.3 Oprava dvouřetězcových zlomů pomocí homologní rekombinace

K opravě dvouřetězcových zlomů pomocí homologní rekombinace dochází v pozdní S a v G2 fázi buněčného cyklu (Takata *et al.* 1998). Na počátku tohoto procesu dochází k rozsáhlé resekci 5' konců, po které vznikají dlouhé ssDNA (single-strand DNA, jednořetězcová DNA) 3' přesahy, dle kterých bude nalezena homologní část sesterské chromatidy. Resekci konců zajišťuje hned několik proteinových nukleáz, za jednu z nejznámějších se dá považovat MRE11 (meiotic recombination 11). MRE11 je protein s endonukleázovou i s exonukleázovou aktivitou. Štěpení zahajuje svou endonukleázovou aktivitou a k další degradaci vlákna využije své 3'-5' exonukleázové aktivity (Shibata *et al.* 2014), kterou však může zastat také EXD2 (Exonuclease 3'-5' Domain Containing 2), což je také 3'-5' exonukleáza (Broderick *et al.* 2016). Vlákno zároveň z druhého konce směrem 5'-3' štěpí exonukleáza EXO1 (Exonukleáza 1) a DNA2, které jsou stimulovány helikázou BLM (Bloom syndrome) (Szankasi a Smith 1992; Nimonkar *et al.* 2008; Nimonkar *et al.* 2011).

Na tyto ssDNA 3' přesahy se nejdříve váží proteiny RPA (replication protein A) (Wold a Kelly 1988; Liu a Weaver 1993). Následně je RPA nahrazen proteinovými filamenti rekombinázy RAD51, což je stimulováno proteinem BRCA2 (Benson *et al.* 1994; Jensen *et al.* 2010). Pro BRCA2 je v tomto procesu nezbytná vazba jeho interakčního partnera PALB2 (Xia *et al.* 2006), který slouží jako lešení pro interakci s proteinem BRCA1. BRCA1 zde slouží k lokalizaci PALB2 (Chen *et al.* 1998; Sy *et al.* 2009; Zhang, Fan, *et al.* 2009). Filamenta RAD51 podporují nalezení sesterské chromatidy či jiné sekvence DNA na základě sekvenční homologie, která bude fungovat jako templát pro opravu zlomu (Sung a Robberson 1995). Nakonec dojde k syntéze DNA dle homologního templátu, která je zajišťována DNA polymerázou (Johnson a Jasin 2000; Li *et al.* 2009).

1.2.3.1.4 Oprava dvouřetězcových zlomů mechanismem C-NHEJ (Non-homologous End-Joining)

C-NHEJ je další proces oprav dvouřetězcových zlomů. Uskutečňuje se převážně v G1 a M fázi buněčného cyklu (Takata *et al.* 1998). Jde o rychlejší, avšak méně přesný způsob opravy dvouřetězcových zlomů (Kochan *et al.* 2017). C-NHEJ zahajuje protein

KU vážící se na konce poškozené DNA, který k sobě fyzicky přiblíží dva konce DNA a tvoří komplex s DNA-PKcs (Blier *et al.* 1993; Cary *et al.* 1997).

Oprava vyžaduje krátkou homologii o délce 1-4 bp ssDNA 3' konců, které jsou zaligovány pomocí komplexu XRCC4 (X-ray repair cross-complementing protein 4) a DNA ligázy IV stimulovaného proteinem XLF (XRCC4 like factor) (Grawunder *et al.* 1997; Chen *et al.* 2000; Gu, Lu, Tippin, *et al.* 2007; Gu, Lu, Tsai, *et al.* 2007). Krátké homologie může být dosaženo několika způsoby, například pomocí polymeráz λ a μ , které přidávají nukleotidy k vláknu bez nutného templátového vlákna (Lee *et al.* 2004; Gu, Lu, Tippin, *et al.* 2007; Moon *et al.* 2014), či degradací konců pomocí endonukleázy ARTEMIS, která je stimulována DNA-PKcs (Ma *et al.* 2002).

Není zcela jasné, jakým mechanismem a do jaké úrovně BRCA1 zasahuje do tohoto buněčného procesu, ale v buňkách s jeho deficiencí výrazně poklesne přesnost C-NHEJ (Zhong *et al.* 2002; Bau *et al.* 2004; Jiang *et al.* 2013).

1.2.4 Další funkce proteinu BRCA1

1.2.4.1 Ubikvitin-ligázová aktivita

BRCA1 vykazuje v heterodimeru s BARD1 enzymatickou E3-ubikvitin ligázovou aktivitu (Meza *et al.* 1999; Hashizume *et al.* 2001). Ubikvitinylace je proces, během kterého dojde k navázání proteinu nazývaného ubikvitin na proteinový substrát. Takto označený protein je následně specificky degradován v proteasomu. V tomto procesu figurují tři proteiny – E1, E2 a E3. Aktivační E1 aktivuje ubikvitin za spotřeby ATP (Adenosin trifosfát). E1 poté přesune ubikvitin na thiolovou skupinu konjugačního E2 za vzniku thio-esterové vazby. Ligační E3, který je rozhodující pro substrátovou specificitu katalyzované reakce, váže substrát a zajistí přesun aktivovaného ubikvitinu na substrát (Hershko *et al.* 1983; Hershko *et al.* 1986; Chau *et al.* 1989).

Mezi substráty E3 aktivity BRCA1-BARD1 heterodimeru patří například ER α (Ma *et al.* 2010), γ -tubulin (Starita *et al.* 2004; Sankaran *et al.* 2007) a RNA polymeráza II (Kleiman *et al.* 2005). RNA polymeráza II, respektive její hyperfosforylovaný serin 5, je cílem ubikvitinace komplexu BRCA1-BARD1 při poškození DNA, ke kterému dojde v době aktivní transkripce, což vede RNA polymerázu II k degradaci (Kleiman *et al.* 2005).

1.2.5 Komplexy BRCA1

BRCA1 vytváří pomocí svých interakčních domén několik různých komplexů s jinými proteiny. Funkce těchto komplexů se od sebe vzájemně liší. Podle hlavního vazebného partnera se označení komplexů ustálilo na BRCA1 A (ABRAXAS), BRCA1 B (BACH1) a BRCA1 C (CtIP) (Wang, Matsuoka, *et al.* 2007). Dalším často zmiňovaným komplexem je komplex BRCA1-PALB2-BRCA2.

1.2.5.1 Komplex BRCA1 A

Komplex BRCA1 A se sestává z proteinů BRCA1, RAP80, BRCC36 (BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 36), NBA1 (new component of the BRCA1 A complex), BRCC45 (BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 45), ABRAXAS a BARD1 (Dong *et al.* 2003; Sobhian *et al.* 2007; Wang, Matsuoka, *et al.* 2007; Wang *et al.* 2009). RAP80 interaguje s BRCA1 prostřednictvím proteinu ABRAXAS, který se váže na BRCT doménu BRCA1 (Wang, Matsuoka, *et al.* 2007). RAP80 obsahuje dvě ubikvitin interakční domény (Yan *et al.* 2007), kterými se váže na lysin 63 řetězce ubikvitinu (Liu *et al.* 2018). Pomocí této interakce drží RAP80 celý komplex BRCA1 A v oblasti dvouřetězcového zlomu DNA (Sobhian *et al.* 2007), kde je katalyzována tvorba ubikvitinových struktur nutných k sestavení plně funkčního DNA reparačního komplexu IRIF (Mailand *et al.* 2007).

1.2.5.1.1 Interakce BRCA1 s BARD1

Interakce BRCA1-BARD1 má E3 ubikvitin-ligázovou aktivitu, viz kapitola 1.2.4.1 Ubikvitin-ligázová aktivita. K interakci těchto dvou proteinů dochází mezi RING doménou BRCA1 a strukturně homologní doménou RING proteinu BARD1 a to vůči sobě antiparalelní pozicí příslušných helixů (Brzovic *et al.* 2001). Interakce BRCA1 s BARD1 způsobuje inhibici exportu BRCA1 z jádra do cytoplazmy, neboť dochází ke skrytí NES proteinu BRCA1. BRCA1 je transportován do jádra převážně v komplexu s BARD1, který je za transport do jádra buňky celého heterodimeru zodpovědný (Fabbro *et al.* 2002).

1.2.5.2 Komplex BRCA1 B

BRCA1 interaguje pomocí své BRCT domény s C-terminální doménou BACH1 a společně vytváří komplex BRCA1 B. BACH1 je 5'-3' helikáza a zároveň DNA-dependentní ATPáza (Cantor *et al.* 2001). Pro interakci BRCA1 s BACH1 je nutná přítomnost fenylalaninu 993 a fosforylace serinu 990 na proteinu BACH1, která je závislá na buněčném cyklu a probíhá v S a G2/M fázi, kdy je tvorba tohoto komplexu vyšší oproti ostatním fázím buněčného cyklu (Yu *et al.* 2003; Shiozaki *et al.* 2004). Během fází S a G2 BACH1 kolokalizuje společně s BRCA1 do jádra (Cantor *et al.* 2001). Na tomto komplexu je závislý kontrolní bod mezi G2 a M fází po poškození DNA IR (ionizační záření) (Yu *et al.* 2003) a je-li v buňce BRCA1 B nepřítomný, přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu je zpožděn (Kumaraswamy a Shiekhattar 2007). Další funkcí BRCA1 B je stimulace aktivity C-NHEJ a bez přítomnosti tohoto komplexu je zvýšena aktivita více chybové A-NHEJ (Dohrn *et al.* 2012). BACH1 dokáže rozvinout D-smyčky, které se tvoří během homologní rekombinace, avšak zda tato funkce je, nebo není závislá na BRCA1, je zatím nevyřešenou otázkou (Gupta *et al.* 2005).

1.2.5.3 Komplex BRCA1 C

BRCA1 C je heterodimerický komplex BRCA1 a CtIP. Interakce těchto proteinů je zprostředkována skrze BRCT doménu BRCA1 (Yu *et al.* 1998). K této interakci dochází pouze po předchozí fosforylaci serinu 327 na CtIP, ke které dochází především v pozdní S fázi buněčného cyklu CDK2 (cyklin-dependentní kinázou 2). Tento komplex podporuje opravu dvouřetězcových zlomů DNA mechanismem homologní rekombinace (Yu a Chen 2004; Yun a Hiom 2009; Buis *et al.* 2012; Ferretti *et al.* 2013) a to pomocí interakce s komplexem MRN. Součástí komplexu MRN je MRE11 s exonukleázovou i endonukleázovou aktivitou, která zajišťuje resekci 5' konců DNA v místě dvouřetězcového zlomu a vytváří tak 3' ssDNA přesahy, které jsou nutné pro opravu DSB homologní rekombinací (Shibata *et al.* 2014). CtIP je kofaktor MRE11 (Anand *et al.* 2016) a CtIP společně s BRCA1 podporuje resekci, která je zajišťována MRE11. Tyto tři proteiny spolu interagují v S a G2 fázi a společně také regulují výběr opravného mechanismu dvouřetězcových zlomů ve prospěch homologní rekombinace (Sartori *et al.* 2007; Chen *et al.* 2008; Escribano-Diaz *et al.* 2013). Bez přítomnosti BRCA1 je resekce

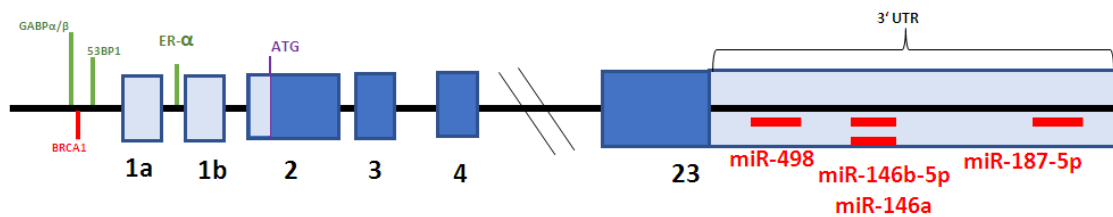
výrazně zpomalena (Cruz-Garcia *et al.* 2014), ačkoliv některé studie tvrdí, že interakce BRCA1 s CtIP není pro samotnou resekcí nutná (Reczek *et al.* 2013; Polato *et al.* 2014).

1.2.5.4 Komplex BRCA1-PALB2-BRCA2

Komplex tří proteinů, BRCA1, PALB2 a BRCA2, má klíčový význam pro opravu DSB pomocí HR. Důležitou roli zde přitom hraje protein RAD51, jehož lokalizace a správná funkce při opravě je závislá na proteinu BRCA2 (Yuan *et al.* 1999). Proteiny BRCA1 a BRCA2 interagují (Chen *et al.* 1998) skrze protein PALB2, který v komplexu slouží jako jejich lešení a lokalizátor BRCA2. Interakce BRCA1 s PALB2 je zajišťována motivy coiled-coil na obou proteinech. Tato interakce je pro homologní rekombinaci vyžadována, neboť BRCA1 je nutný pro správnou lokalizaci PALB2 a BRCA2 k poškozenému místu DNA (Sy *et al.* 2009; Zhang, Fan, *et al.* 2009; Zhang, Ma, *et al.* 2009). Úlohou BRCA2 je poté kromě lokalizace také schopnost proteinu RAD51 vázat DNA a tím podporovat HR (Davies *et al.* 2001; Jensen *et al.* 2010).

1.2.6 Regulace exprese genu *BRCA1*

Genová exprese je komplexní proces, během kterého dochází k převodu informace uložené v sekvenci DNA do funkčních genových produktů v podobě proteinů, či do nekódujících RNA. Pro buňky je nezbytné množství genových produktů regulovat, k čemuž využívají různé mechanismy, souhrnně označované jako regulace genové exprese. Celý tento proces probíhá na několika úrovních: regulací transkripce (Atkinson a Halfon 2014), regulací post-transkripčních procesů, regulací pomocí miRNA (micro RNA), regulací stability mRNA (messenger DNA) a regulací translace (Day a Tuite 1998). V případě genu *BRCA1* bylo dosud popsáno několik odlišných typů regulace jeho exprese a to na úrovni transkripce, alternativního sestřihu, na regulaci pomocí miRNA a na regulaci translace (**Obr. 5**)



Obrázek 5: Schématický obrázek cis regulačních oblastí genu *BRCA1*. Na obrázku jsou nekódující části exonů vyznačeny jako obdélníky vyplněné **světle modře**. **Tmavě modře** jsou vyplněné nekódující části exonů. Hlavní pozitivní trans-regulátory transkripce genu (*GABPα/β*, *53BP1*, *ER-α*) jsou znázorněny **zeleným** písmem a vertikálními čarami, které označují oblast konsenzního vazebného místa příslušného transkripčního faktoru, zatímco negativní regulátory jsou znázorněny písmem **červeným**. 5' UTR (5' untranslated region, 5' nepřekládaná oblast) oblast se skládá ze dvou částí – 5' UTR v části nekódujícího exonu *1a* je znázorněna žlutým pozadím a 5' UTR oblast exonu *1b* je znázorněna tečkovaným vzorem. **Červené** horizontální čáry značí přibližnou oblast popsaných interakcí s miRNA a vertikální čáry značí místo, kam se váží negativní proteinové regulační faktory (*BRCA1*). Fialová horizontální čára značí přibližné místo iniciačního kodonu *ATG*, kde začíná translace.

1.2.6.1 Regulace genu *BRCA1* na úrovni transkripce

Transkripce je regulována součinností *cis* elementů na DNA a proteinových transkripčních faktorů. Jejich interakce s následným vlivem na transkripci je zároveň silně ovlivněna přístupností DNA, charakterizovanou stupněm kondenzace, respektive strukturou chromatinu a dále úrovní metylace. Celkový dopad na transkripci přitom může být jak pozitivní (aktivátory transkripce) tak negativní (represory) (Lelli *et al.* 2012).

Transkripce *BRCA1* je řízena dvěma různými promotory, α a β , které produkují dva různé transkripty, *BRCA1a* a *BRCA1b*, z nichž každý má svůj vlastní počátek transkripce. Promotor α je obousměrný a reguluje jak transkripci *BRCA1*, tak sousedního *NBR2*. Ani jedna z proximálních promotorových oblastí neobsahuje TATA box (Xu *et al.* 1995; Xu *et al.* 1997).

Transkripční aktivita *BRCA1* promotoru je nepřímo stimulována několika hormony, z nichž nejlépe popsány je estrogen (Gudas *et al.* 1995; Marks *et al.* 1997). V proximální části promotoru *BRCA1* se nachází element pro vazbu transkripčního faktoru AP-1 (activator protein 1). Po stimulaci buňky estrogenem je k AP-1 přiveden aktivovaný ER α společně s p300 a SRC-1 (steroid receptor coactivator 1). SRC-1 a p300 mají histon-acetyltransferázovou aktivitu pomocí které indukují acetylaci histonů a

zesilují tak transkripci (Sealy a Chalkley 1978; Lin *et al.* 1989; Ogryzko *et al.* 1996; Spencer *et al.* 1997). Stimulaci estrogenem lze však přerušit, pokud je na něj vázán protein AhR (aryl hydrocarbon receptor) a jeho ligand TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin). Po navázání TCDD na AhR odpadnou transkripční faktory p300 a SRC-1 ze svého vazebného místa. Následně jsou do místa aktivního promotoru přivedeny histon deacetylázy, které deacetylací histonů sníží aktivitu transkripce (Yang a Seto 2003; Jeffy *et al.* 2005; Hockings *et al.* 2006). Kromě estrogenu byla také popsána stimulace transkripci *BRCAl* pomocí prolaktinu (Favy *et al.* 1999) a progesteronu (Gudas *et al.* 1995). Mechanismus jejich účinku však nebyl dosud plně charakterizován.

Dále bylo u *BRCAl* popsáno několik proteinových aktivátorů transkripce. Mezi ně patří protein FRBR (factor required for *BRCAl* transcription), který kromě *BRCAl* reguluje také *NBR2* a váže se do proximálního promotoru α (Suen *et al.* 2005). Dále v regionu proximálního promotoru α leží element nazvaný RIBS nacházející se cca -200 bp od počátku transkripce *BRCAla*. Na RIBS se váže transkripční faktor GABP α/β (GA-binding protein α/β) figurující v tomto místě jako transkripční aktivátor (Xu *et al.* 1997; Atlas *et al.* 2000). Další dílčí pozitivní regulační element, CREB (cAMP response element-binding protein), se nachází v oblasti 176 až 166 „upstream“ od počátku transkripce *BRCAla*. Na ten se váží transkripční faktory CRE (cAMP response elements) a ATF-1 (activating transcription factor 1) (Atlas *et al.* 2001).

Další pozitivní regulátor vázající se na oblast proximálního promotoru je protein 53BP1 (Rauch *et al.* 2005). 53BP1 je, stejně jako BRCA1, asociován s výběrem mechanismu oprav v případě DSB a přímo se i podílí na opravě DNA. Chrání konce DNA proti rozsáhlým resekčním, které vedou k opravám mechanismem homologní rekombinace, a tudíž podporuje C-NHEJ cestu oprav dvouřetězcových zlomů při poškození. K tomu mu pomáhají jeho interakční partneři RIF1 a PTIP (PAX transcription-activation domain-interacting protein), které resekci brání. Tato skutečnost naznačuje význam BRCA1 v procesu regulace DNA reparačních procesů (Escribano-Diaz *et al.* 2013; Zimmermann *et al.* 2013).

Několik případů pozitivní regulace existuje i mimo proximální promotor *BRCAla*. První z nich je element ležící na intronu 2 a druhý ležící na intronu 12 (Dos Santos *et al.* 2018). Distálně od promotoru *BRCAl* α se potom váže protein c-myc (Chen *et al.* 2011). Transkripční faktor c-myc je pozitivním regulátorem buněčné proliferace. Zvýšená

exprese BRCA1 byla popsána v proliferaujících buňkách. Tento fakt naznačuje specifickou funkci BRCA1 v regulaci buněčného cyklu, proliferaci a diferenciaci tkání. (Gudas *et al.* 1996; Vaughn *et al.* 1996; Bretonnes *et al.* 2015).

Velmi zajímavým fenoménem ovlivňujícím transkripci *BRCA1a* je jeho negativní autoregulace vlastním proteinovým produktem, který snižuje aktivitu transkripce a který asociuje s regionem proximálního promotoru. Protein BRCA1 se na tuto oblast neváže přímo, ale skrze své interakční proteinové partnery E2F-1 (E2 Transcription Factor) a Rb se kterými tvoří komplex (De Siervi *et al.* 2010). Kromě toho je exprese BRCA1 negativně regulována korepresorem CtBP (carboxyl-terminal binding protein) vážícího se do oblasti proximálního promotoru. CtBP je aktivní zejména v prostředí s nižším poměrem NAD^+/NADH (nikotinamid adenin dinukleotid) a tudíž jde o případ metabolicky závislé represe. CtBP zvyšuje aktivitu HDAC (histon deacetyláza), čímž brání acetylaci N-konců H3 a H4 histonů v blízkosti proximálního promotoru (Turner a Crossley 1998; Deng *et al.* 2010; Di *et al.* 2010), které indukují deacetylaci N-konců histonů spojenou s nižší aktivitou transkripce (Yang a Seto 2003).

Kromě CtBP se na proximální promotor *BRCA1a* samostatně váží transkripční faktory E2F-4, E2F-6, p130 a p107, které transkripci také regulují negativně (Wang *et al.* 2000; Oberley *et al.* 2003; Bindra *et al.* 2005). Faktory rodiny E2F se váží na dva různé *cis* elementy (Bindra a Glazer 2006). Součástí proximálního promotoru je i tzv. UP represivní *cis* element, na který se váže transkripční faktor GABP α/β , který v tomto případě slouží jako represor (Bindra a Glazer 2006; MacDonald *et al.* 2007).

Popsány byly i negativní regulátory transkripce *BRCA1* mimo proximální promotor. Mezi ně patří transkripční faktor BP1, který se váže se do oblasti prvního intronu *BRCA1* (Kluk *et al.* 2010). Ke zřejmému významu intronů pro regulaci *BRCA1* přispívá i represivní *cis* element intronu 1 (Suen a Goss 2001) a dva konzervované represivní *cis* elementy nacházející se na intronu 2, až 2,5 kbp (páry kilobazí) „downstream“ od promotoru *BRCA1a* (Wardrop a Brown 2005).

Nalezena byla souvislost mezi transkripčním represorem ID4 (Inhibitor of differentiation 4) a transkripcí *BRCA1*, ačkoliv se neví, zda ID4 snižuje aktivitu transkripce *BRCA1* přímo, nebo nepřímo (Beger *et al.* 2001). Jiná studie ukazuje, že

protein BRN-3B (Brain-specific homeobox 3b) rodiny POU (Pit-1, Oct-1, Unc-86) má inhibiční efekt na transkripci i translaci *BRCA1* (Budhram-Mahadeo *et al.* 1999).

Promotor α pseudogenu $\psi BRCA1$ vykazuje až desetkrát nižší transkripční aktivitu než promotor α genu *BRCA1*. α promotor $\psi BRCA1$, na rozdíl od standardního α promotoru *BRCA1*, neobsahuje elementy pro vazbu CREB, element RIBS a elementy pro vazbu E2F, avšak oba obsahují shodný element pro vazbu transkripčního faktoru SP1 (specificity protein 1) (Pettigrew *et al.* 2010). Jednou z dosud nepopsaných možností regulace transkripce *BRCA1* je tedy kompetice promotoru α - $\psi BRCA1$ o transkripční faktory se standardním promotorem α *BRCA1*.

Dalším regulačním mechanismem transkripce je míra metylace promotoru v oblasti CpG ostrůvků, která je spojena s nižší aktivitou transkripce *BRCA1* (Rice *et al.* 2000) i s nižší koncentrací proteinu BRCA1 (Niwa *et al.* 2000). Hypermethylace cytidinů v CpG ostrůvcích některých genů byla spojena s maligní transformací buňky (Esteller *et al.* 2001). V případě tumor supresoru *BRCA1* jsou epigenetické změny považovány za jeden z mechanismů ztráty heterozygosity s přímým dopadem na maligní transformaci postižené buňky.

Proximální promotor α obsahuje region, který odpovídá definici CpG ostrovu (Gardiner-Garden a Frommer 1987; Magdinier *et al.* 2000). K metylaci cytosinů v promotoru *BRCA1* u buněk zdravé tkáně nedochází. Pro nádorové buňky je však hypermethylace promotoru *BRCA1* s následnou represí transkripce typická a představuje tak jeden z mechanismů inaktivace tohoto důležitého tumor supresoru. Tyto metylace se týkají především oblasti CREB promotoru rozpoznávané transkripčním faktorem CRE (Mancini *et al.* 1998; Catteau *et al.* 1999). Bylo popsáno, že tato metylace znemožní transkripčnímu faktoru CRE se do této oblasti vázat, což má za následek sníženou expresi BRCA1 (DiNardo *et al.* 2001). Bylo také prokázáno, že kompletní metylace cytosinů v CpG dinukleotidech proximálního promotoru *BRCA1* je spojena s hypoacetylací N-konců histonů H3, H4 a s kondenzací chromatinu v této oblasti (Rice a Futscher 2000).

1.2.6.2 Regulace exprese BRCA1 pomocí miRNA

Expresi genů lze ovlivňovat pomocí miRNA, které se váží především na 3' UTR (3' untranslated region, 3' nepřekládaná oblast) mRNA a které snižují expresi genů (Lim

et al. 2005). I *BRCA1* je cílem některých miRNA, konkrétně v oblasti 3' UTR *BRCA1*, kam se váží miR-146a a miR-146b-5p. Zvýšená exprese těchto miRNA byla detekována ve větším množství v buňkách triple-negativních basal-like karcinomů prsu (Matamala *et al.* 2016), které jsou spojeny s hereditárními karcinomy způsobenými *BRCA1* (Garcia *et al.* 2011). Dalšími identifikovanými miRNA, které inhibují expresi *BRCA1* a váží se na 3' UTR, jsou miR-498, mající vazebné místo na nukleotidech 168-189 od začátku 3' UTR, a miR-187-5p, mající vazebné místo na nukleotidech 1010-1032 od počátku 3' UTR (Matamala *et al.* 2016).

Kromě popsaných vazebných míst pro miRNA byla identifikována u pacientů sekvenční alterace v 3' UTR, která vytvoří nové místo pro vazbu miR-103 (Brewster *et al.* 2012).

1.2.6.3 Regulace translace *BRCA1*

K regulaci exprese dochází také na úrovni translace. Její aktivita může být mimo jiné závislá na sekvenci nukleotidů v konsensu Kozakové (Kozak 1987). Studie Wanga *et al.* popsala u pacientů genetickou variantu *BRCA1* v této sekvenci, konkrétně v místě -2 od iniciačního kodónu AUG, která negativně ovlivňuje translaci (Wang, Lu, *et al.* 2007). Další studie objevila u jiného pacienta genetickou variantu na místě -3 od iniciačního kodónu, která též snižuje aktivitu translace (Signori *et al.* 2001).

Translace *BRCA1* může být regulována i stabilními sekundárními strukturami, které se tvoří v 5' UTR (5' untranslated region, 5' nepřekládaná oblast). To může vysvětlit, proč má exon 1b až desetkrát nižší translační aktivitu než exon 1a. V 5' UTR regionu exonu 1a se totiž nachází jen jedna sekundární struktura dost stabilní na to, aby snižovala translaci, zatímco v 5' UTR regionu exonu 1b se takové struktury nachází tři a vykazují vyšší stabilitu. (Sobczak a Krzyzosiak 2002).

1.2.6.4 Tkáňově specifická exprese genu *BRCA1*

Exprese genu *BRCA1* na úrovni proteinu i mRNA se kupodivu nijak neliší mezi tkáněmi, ve kterých dochází k rozvinutí tumorů u nosičů mutací v *BRCA1* a tkáněmi, ve kterých k rozvinutí tumoru u nosičů nedochází (Uhlen *et al.* 2015; ProteinAtlas 2019).

Obecně je gen *BRCA1* pokládán za velmi slabě exprimovaný a množství mRNA se v různých tkáních stabilně pohybuje v řádu desítek až stovek molekul na jednu buňku.

Vzhledem k funkci BRCA1 není překvapivé, že jeho zvýšená exprese byla popsána v proliferující tkáni a snížená exprese se naopak objevuje ve tkáních, které neproliferují a buňky jsou ve fázi G0 (Gudas *et al.* 1996; Vaughn *et al.* 1996). Množství BRCA1 se však mění v závislosti na buněčném cyklu. mRNA genu *BRCA1* je v buňkách v nejvyšším množství ve G1 fázi buněčného cyklu a před vstupem do S fáze (Gudas *et al.* 1996; Vaughn *et al.* 1996), což koreluje se stabilitou mRNA *BRCA1*, která je během G1 fáze nejvyšší (Signori *et al.* 2001). Množství proteinu BRCA1 je v buňkách před G1 fází nejnižší, v G1 fázi roste a v S fázi je množství BRCA1 nejvyšší. V M fázi je poté množství proteinu lehce sníženo (Gudas *et al.* 1996; Chen, Farmer, *et al.* 1996; Vaughn *et al.* 1996).

Protože se v buňce nachází jen malé množství kopií proteinu BRCA1, je pečlivá regulace důležitá, neboť jeho snížené množství v buňce může souviset s maligní transformací.

2. Cíle práce

Karcinom prsu představuje celosvětově velmi závažný zdravotní problém. V České republice je každý rok diagnostikováno téměř 7000 nových případů karcinomu prsu, což představuje zhruba 15 % všech diagnostikovaných nádorových onemocnění u žen ročně. Více než 1400 pacientů na karcinom prsu každý rok zemře. Výdaje na léčbu tohoto nádorového onemocnění se pohybují okolo 2 miliard korun ročně. Z tohoto hlediska je proto nutné zaměřit se na výzkum zabývající se efektivní predikcí rizika a na stanovení optimálních léčebných a preventivních postupů pomocí tzv. personalizace. Masivní rozvoj použití NGS (Next generation sequencing – sekvenování nové generace) technik pro genetické vyšetření umožňuje na jedné straně rychlé vyšetření velkého množství genů, ale na druhé straně vede k identifikaci značného množství dosud nepopsaných sekvenčních alterací s nejasným klinickým významem (VUS – Variant of unknown clinical significance). Značná část těchto sekvenčních variant je nalezena v nekódujících regulačních oblastech klíčových genů (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2* aj.). Přiradit nalezeným variantám jednoznačný klinický význam je však obtížné, ale důležité, zejména z hlediska diagnostiky, prevence a léčby. Stanovení vztahu mezi sekvenční modifikací v nekódující oblasti genů s rizikem vzniku hereditární formy karcinomu prsu by zároveň mohlo vysvětlit, proč je v současné možné uspokojivě vysvětlit genetický původ pouze 45 % případů familiární formy karcinomu prsu.

Pracovní hypotéza:

Vzhledem k tomu, že zatím nebyly charakterizovány žádné mutace v nekódujících sekvencích genu *BRCA1*, nedokážeme s jistotou říct, že alterace v této oblasti může negativně ovlivnit expresi genu *BRCA1* a přispět tak k riziku vzniku karcinomu prsu. Pro všechny studie zabývající se klinickou klasifikací sekvenčních alterací v regulačních nekódujících oblastech tedy chybí pozitivní kontrola, umožňující stanovit vztah mezi množstvím proteinu a biologickou aktivitou produktu exprese genu *BRCA1*. Protein *BRCA1* je multifunkční protein, bez vlastní katalytické aktivity. Obecně uznávanou hlavní funkcí *BRCA1* je jeho přímá účast na opravě dvouřetězcových zlomů DNA pomocí homologní rekombinace, kde figuruje jako protein-protein interakční modulátor. Tato práce se zabývá popsáním vztahu míry exprese genu *BRCA1* a aktivity homologní rekombinace v rámci modelového systému. Výsledky mohou sloužit jako

základ pro funkční charakterizaci vybraných sekvenčních alterací v nekódujících regulačních oblastech genu *BRCA1* a jejich následnou klinickou klasifikaci.

Cílem práce je odpovědět na tyto otázky:

1. Jaký je vztah mezi mírou exprese genu *BRCA1* a aktivitou homologní rekombinace?

Při genetickém vyšetření vysoce rizikových jedinců jsou relativně často nalezeny případy familiární formy karcinomu prsu s typicky *BRCA1* tumorem (triple negativní basal-like karcinom), ovšem bez příčinné alterace v kódující sekvenci genu *BRCA1*. Jedno z možných vysvětlení je přítomnost patologické sekvenční alterace v nekódujících regulačních oblastech genu, které se při genetickém vyšetření standardně nesekvencují a které mohou ovlivnit expresi proteinu *BRCA1*.

2. Mohou alterace v nekódující regulační oblasti ovlivnit biologickou funkci genu *BRCA1* vzhledem k riziku vzniku karcinomu prsu?

Úkolem této práce bylo:

- Vytvoření a optimalizace modelového systému umožňujícího funkční *in vitro* charakterizaci sekvenčních alterací v regulačních nekódujících oblastech známých genů predisponujících ke vzniku hereditární formy karcinomu prsu.
- Funkční charakterizace vybraných sekvenčních alterací v 5' UTR genu *BRCA1* pomocí vytvořeného modelového systému.

3. Metody

K vytvoření modelového systému byla použita stabilní buněčná linie adherentních buněk odvozených od lidského osteosarkomu U2 OS se stabilně inkorporovaným reportérovým systémem DR-GFP (Direct repeat – green fluorescent protein). Cílem práce bylo navržení a vytvoření expresního konstruktů CRISPR-Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) a donoru pro efektivní modifikaci genomu buněk modelového systému pomocí homologní rekombinace. Takto navržený a optimalizovaný systém byl následně využit pro stanovení závislosti aktivity homologní rekombinace na množství proteinu BRCA1 v buňkách a dále pro funkční charakterizaci vybraných sekvenčních alterací v nekódující 5' oblasti genu *BRCA1*.

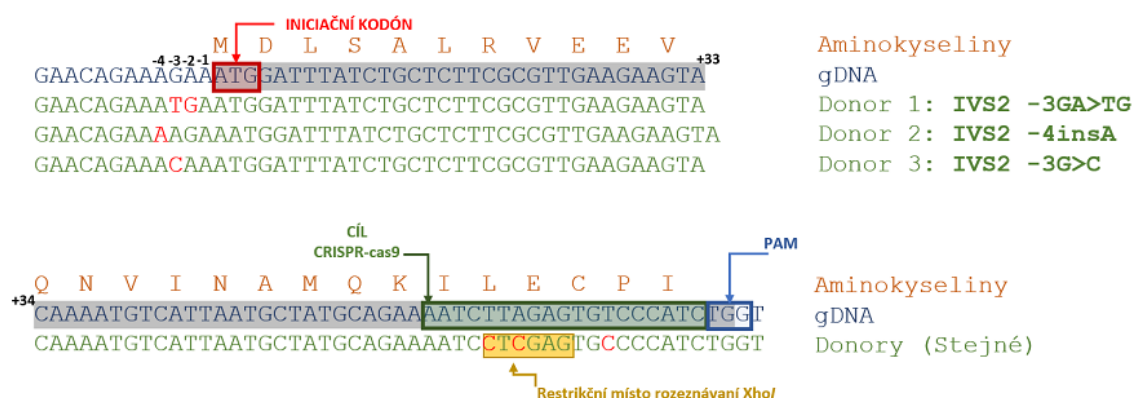
Studované sekvenční alterace byly do genomu buněk modelového systému zavedeny ko-transfekcí expresního plazmidového konstruktů CRISPR-Cas9 spolu s donorovým plazmidem obsahujícím sekvenci homologní k 5'UTR oblasti genu *BRCA1*.

Funkční charakterizace vybraných sekvenčních alterací byla provedena stanovením jejich vlivu na expresi genu *BRCA1* a to na úrovni proteinu pomocí ELISA a na úrovni mRNA pomocí RT-qPCR (Quantitative real-time PCR). Dále byl stanoven vliv studovaných variant na aktivitu homologní rekombinace v buňkách modelového systému pomocí reporterového systému DR-GFP s využitím průtokové cytometrie.

3.1. Konstrukce CRISPR-Cas9 vektoru pro modifikaci 5' UTR genu *BRCA1*

S ohledem na co nejvyšší účinnost genové modifikace by cílové místo pro aktivní CRISPR-Cas9 mělo být lokalizováno v bezprostřední blízkosti plánovaného zásahu (knock-in). Současně s tím je ale nezbytné zajistit, aby aktivní CRISPR-Cas9 rozeznával jen cílovou gDNA (genomová DNA) a neštěpil donorovou DNA. Toho lze dosáhnout zavedením synonymní alterace do donorové sekvence v místě rozpoznávaném použitým systémem CRISPR-Cas9. Vzhledem k tomu, že se plánované modifikace nachází v nekódující regulační oblasti genu *BRCA1*, nachází se nejbližší místo umožňující zavedení synonymní alterace v prvním kódujícím exonu (exon 2). Synonymní alterace byla navíc zavedena takovým způsobem, aby vedla ke vzniku unikátního restričního místa rozpoznávaného restriční endonukleázou *XhoI*. Toto restriční místo bylo do

DNA zavedeno pro selekci pozitivně modifikovaných buněk (**Obr. 6**).



Obrázek 6: Schématické znázornění pozice použitých sekvenčních alterací v donorové sekvenci pro modifikaci genu *BRCA1*. Část donorové sekvence wild type (wt) je zobrazena tmavomodrým písmem. Tato sekvence obsahuje iniciační kodón (v **červeném** rámečku), cíl CRISPR-Cas9 systému (v **zeleném** rámečku) a sekvence PAM (v **modrém** rámečku). Sekvence různých inzertů, ve kterých jsou zavedeny modifikace, jsou znázorněny **zeleným** písmem. Všechny nukleotidy, které se od původní sekvence liší, jsou znázorněny **červeným** písmem. Ve **žlutém** rámečku je na modifikované sekvenci (která je pro všechny typy donorových sekvencí stejná) znázorněno restriční místo, které je po zavedení modifikací rozeznáváno XhoI. **Oranžovým** písmem je znázorněna sekvence aminokyselin, která se nemění ani v případě zavedení modifikace do kódující sekvence, neboť jde o synonymní alterace.

3.1.1. Navržení sgRNA

sgRNA (single guide RNA) je strukturální součástí aktivního ribonukleoproteinu CRISPR, která zajišťuje sekvenční specifitu endonukleázy cas9 na základě vzájemné komplementarity sgRNA a cílové DNA. Tento oligonukleotid musí být komplementární k 19-ti nukleotidům cílové DNA a musí přímo sousedit s motivem PAM (protospacer adjacent motif; konsensní sekvence NGG) na 3' konci cílové DNA. V oblasti PAM dojde k rozštěpení obou řetězců cílové DNA a vzniku dvouřetězcového zlomu (Jinek *et al.* 2012).

Pro navržení sekvence sgRNA cílené do oblasti genu *BRCA1* (hg 19; Chr 17:41,276,114 – 41,276,150) byl využit volně přístupný program „CHOP CHOP“ (Labun *et al.* 2019). Z navržených sgRNA byla vybrána přednostně ta, která dle použitého programu vykazovala nejmenší počet tzv. „off-target“ cílů. Dalším kritériem výběru byla

přítomnost nukleotidu T na 3' konci použité sgRNA a co nejvyšší účinnost vyjádřená číselným koeficientem 0.39 (dle použitého programu). Na základě těchto kritérií byly pro přípravu CRISPR expresního vektoru navrženy oligonukleotidy:

Sense: 5' - **CACCGAATCTTAGAGTGTCCCATC** - 3'

Antisense: 5' - **AAACGATGGGACACTCTAAGATTC** - 3'

Jednotlivé řetězce sgRNA se skládají z 19-ti nukleotidů cílové sekvence (znázorněny **modře**) a místa rozpoznávaného restriční endonukleázou *BbsI* (znázorněny **červeně**), které bude sloužit pro klonování inzertu do expresního vektoru px330, kterému se věnuje následující podkapitola (3.1.2 Příprava expresního vektoru px330). Oligonukleotidy byly syntetizovány firmou GeneriBiotech v množství 40 nmol se standardní purifikací pomocí OPC™ („Oligonucleotide Purification Cartridge“ od firmy Thermo Fisher).

3.1.2. Příprava expresního vektoru px330

Expresní vektor, který byl použit pro expresi CRISPR-Cas9, je plazmid px330 s U6 promotorem, který je chimérický, neboť umožňuje expresi jak sgRNA, tak proteinu hSpCas9. Jeho délka je 8506 bp, obsahuje kazetu rezistence k ampicilinu a byl vytvořen v laboratoři Feng Zhanga (pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9). Plazmid byl získán z databáze Addgene: plasmid #42230; <http://n2t.net/addgene:42230>; RRID: Addgene_42230 (Cong *et al.* 2013).

Sense i antisense sgRNA byly naředěny pomocí ddH₂O (destilovaná H₂O) na koncentraci 100 μM. Nejprve byla provedena modifikace volných 5' konců sgRNA oligonukleotidů fosforylací, katalyzovanou polynukleotid kinázou (PNK) s následnou hybridizací obou polynukleotidových částí. To bylo provedeno následujícím způsobem: Do čisté zkumavky byl přidán 1 μl roztoku se sense sgRNA a 1 μl roztoku s antisense sgRNA. K nim bylo přidáno 1 μl 10x koncentrovaného ligačního pufru (New England Biolabs), 1 μl „T4 PNK“ (New England Biolabs; koncentrace 10 U/ μl) a do výsledného objemu 10 μl byla přidána ddH₂O. Tato směs byla inkubována v termocykléru při 37 °C po dobu 30 minut. Následně byla teplota zvýšena na 95 °C a po 5-ti minutách v této teplotě následovalo postupné ochlazování na 25 °C a to snížením teploty o 5 °C každou 1 minutu. Po skončení programu byl výsledný produkt naředěn 1:199 ddH₂O.

Následovala ligace. Ve zkumavce byla připravena ligační směs, která se sestávala ze 100 ng vektoru pX330Cas9, 2 μ l 10x „CutSmart®“ pufru (New England Biolabs), 1 μ l 10mM dithiothreitolu (DTT), 1 μ l 10mM ATP, 0.5 μ l T7 ligázy (3 000 U/ μ l, New England Biolabs), 1 μ l „FastDigest BbsI“ (10 U/ μ l, New England Biolabs), 2 μ l ředěných oligo duplexů připravených v předchozím kroku a 12 μ l ddH₂O. Směs byla pro zaligování inzertu inkubována v termocykléru, a to v šesti dvoufázových cyklech. Obě fáze probíhaly 5 minut. První při teplotě 37 °C a druhá při 21 °C.

Pro zbavení se linearizované DNA, která nebyla zaligována, byla použita exonukleáza štěpící lineární DNA, „PlasmidSafe DNáza.“ Pro tuto metodu byl použit kit „Plasmid-Safe™ ATP-Dependent DNase“ (Epicentre) následujícím způsobem: Do produktu po inkubaci v termocykléru z předchozího kroku byl přidán 1.5 μ l 10x „PlasmidSafe“ pufr, 1.5 μ l 10mM ATP a 1 μ l „PlasmidSafe“ exonukleázy (10 U/ μ l, New England Biolabs). Směs byla 30 minut inkubována v termocykléru při teplotě 37 °C a dalších 30 minut při teplotě 70 °C. Výsledná reakční směs byla následně transformována do chemicky kompetentních buněk.

3.1.3. Transformace plazmidů do kompetentních buněk

Pro amplifikaci vektorů byly použity chemicky kompetentní buňky „One Shot™ TOP10“ *Escherichia coli* (Invitrogen™). Do této buněčné suspenze o objemu 50 μ l, která byla držena na ledu, bylo přidáno 25 μ l produktu ligační reakce z předchozího kroku. Zkumavky byly poté 30 minut inkubovány na ledu. Následně byl proveden teplotní šok při 42 °C, ve kterém byly zkumavky ponechány přesně 1 minutu. Poté byly zkumavky s transformační reakcí vráceny na led, kde byly ponechány 2 minuty. Dále bylo do zkumavek s kompetentními buňkami přidáno 200 μ l živného média LBM (Luria-Bertani medium). Buňky byly 2 hodiny inkubovány v třepačce při 220 otáčkách/minutu při 37 °C. Následně byly buňky vysety na pevný agar LBA (Luria-Bertani Agar) s přidaným ampicilinem (100 μ g/ml) a inkubovány při 37 °C přes noc. Z narostlých bakteriálních buněk byla následně izolována plazmidová DNA.

3.1.4. Izolace plazmidové DNA

Pro izolaci plazmidové DNA byl použit kit „NucleoBond® Xtra Mini/Midi“ (Macherey-Nagel). Dle množství vstupního materiálu - suspenze transformovaných kompetentních buněk, byl použit Mini/Midi postup.

Pro **Mini** preparaci DNA (použito pro krok 3.1 Konstrukce CRISPR-Cas9 vektoru pro modifikaci 5' UTR genu *BRCA1* a pro krok 3.2.2: Klonování do vektoru („*STRATA clone systém*“) byly buňky z jedné bakteriální kolonie zaočkovány do baněk obsahujících 3 ml živného média LBM s přidavkem ampicilinu (100 µg/ml). Baňky s kulturou byly kultivovány 8 hodin na laboratorní třepače při 220 ot/min a při teplotě 37 °C.

Pro **Midi** preparaci DNA (použito pro krok 3.2.3: Site-directed mutagenese) byly buňky z jedné bakteriální kolonie zaočkovány nejprve do 2 ml LBM s přidavkem ampicilinu a po dvou hodinové inkubaci při 220 ot/min a při teplotě 37 °C byla tato kultura naředěna čerstvým LBM na objem 50 ml a kultivována přes noc na třepače při rychlosti 220 rpm a teplotě 37 °C.

Buňky byly následně 10 minut centrifugovány v rychlosti 6 000 × g při 4 °C. Pelet buněk byl po centrifugaci usazen na dně a supernatant byl odstraněn.

K peletu buněk bylo přidáno 8 ml / 12 ml (Mini / Midi preparace) resuspendačního pufru „RES“ (Macherey-Nagel) s přidavkem „RNAsy A“ (Macherey-Nagel) a tato směs byla homogenizována pomocí pipety. Do suspenze bylo následně přidáno 8 ml / 12 ml lyzačního pufru „LYS“ (Macherey-Nagel) a zkumavky byly několikrát ručně otočeny, dokud se směs neobarvila do modra. Zkumavky byly poté inkubovány 5 minut při pokojové teplotě. Ekvilibrace NucleoBond® Xtra (Macherey-Nagel) kolonek proběhla tak, že do nich byl vsazen kolonový filtr, na jehož okraje bylo aplikováno 12 ml / 25 ml ekvilibračního pufru „EQU“ (Macherey-Nagel). 8 ml/12 ml neutralizačního pufru „NEU“ (Macherey-Nagel) bylo přidáno do modré směsi s buněčným lyzátem. Se zkumavkou bylo otáčeno tak dlouho, dokud se směs neodbarvila. Poté byla bezbarvá směs přenesena do ekvilibračního filtru na NucleoBond® Xtra kolonce. Po vyprázdnění filtru bylo pro jeho vymytí přidáno 5 ml / 15 ml ekvilibračního pufru „EQU“ (Macherey-Nagel) a filtr byl odstraněn. Pro propláchnutí „NucleoBond® Xtra“ kolonek bylo přidáno 8 ml / 25 ml promývacího pufru „WASH“ (Macherey-Nagel). Eluce plazmidové DNA

byla provedena přidáním 5 ml / 15 ml elučního pufru „ELU“ (Macherey-Nagel) do nové zkumavky.

Pro precipitaci eluované plazmidové DNA bylo přidáno 3.5 ml / 10.5 ml isopropanolu, načež byla tato směs vortexována a poté centrifugována při $15\,000 \times g$ 30 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 2 ml / 4 ml 70 % ethanolu. Směs byla centrifugována při $15\,000 \times g$ 5 minut za pokojové teploty. Supernatant byl odsátý pipetou, zkumavka byla ponechána v pokojové teplotě pro vysušení a pelet byl po usušení rozpuštěn v ddH₂O. Správnost konstruktů byla ověřena sekvenováním inzertů v jeho plné délce viz 3.1.5.

3.1.5. Sekvenování

Sekvenování bylo provedeno Sangerovou metodou s fluorescenčně značenými terminátory. Pokud byl jako templát pro sekvenční reakci použit PCR produkt, bylo nejprve provedeno ošetření templátu pomocí „ExoSAP-IT™“ (Affymetrix, Inc) následujícím způsobem: Nespotřebované primery a dNTP's z předchozí PCR reakce byly odstraněny přidáním 1 μl „ExoSAP-IT“ činidla na každých 5 μl PCR produktu s následnou inkubací 15 min v $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Inaktivace „ExoSAP-IT“ byla provedena přidáním 1 μl 10mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) do reakční směsi a inkubací při $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 min.

Sekvenační reakční směs byla připravena smícháním 1 μl „BigDye v 3.1“ (Applied Biosystems), 2 μl 5x „sequencing“ pufru (Applied Biosystems) 4 pmol primeru, 0.5 ng templátu DNA a 1.5 μl ddH₂O.

Sekvence primerů použitých pro sekvenaci:

Sense: 5' – AGCTAAGGCTACCACCACCTAC –3'

Antisense: 5' – GCCATTTCAAGTGATGGAGCTTG –3'

Po sekvenční reakci byl DNA produkt purifikován pomocí EDTA/acetát/ethanolové precipitace. Do zkumavek se sekvenční reakcí bylo přidáno 1 μl 0.125M EDTA, 1 μl 3M NaAc (acetát sodný; pH=5.2) a 30 μl 100 % ethanolu. Směs byla míchána 1 minutu na vortexu a následně byla ponechána 5 minut při pokojové teplotě. Zkumavky byly po tomto kroku centrifugovány 25 minut při $14\,000 \times g$. Po této centrifugaci byl odsát supernatant a peleta DNA opláchnuta přidáním 60 μl 70 %

ethanolu. Následně byla opakována centrifugace, při rychlosti $14\,000 \times g$ 15 minut. Supernatant byl odsátý a vzorky byly 5 minut inkubovány v $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro úplné vysušení ethanolu. Nakonec byl precipitát rozpuštěn ve $12\ \mu\text{l}$ formamidu (Sigma Aldrich). Před kapilární separací byla provedena denaturace DNA inkubací při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 min.

Separace sekvenační reakce pomocí kapilární elektroforézy a následné vyhodnocení bylo provedeno v automatickém sekvenátoru ABI 3130 Genetic Analyzer (Hitachi) na kapilárách o délce 36 cm s použitím polymeru POP-6 (ThermoFisher Scientific). Aplikace vzorku elektro-injekcí trvala 15 sekund, separace byla v závislosti na délce analyzovaného produktu prováděna po dobu 40 – 90 min. Sekvenační reakce byly vyhodnocovány v programu FinchTV 1.5.0 (Geospiza Inc.; Seattle).

3.1.6. Stanovení koncentrace nukleových kyselin

Koncentrace nukleových kyselin byla stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer měřením při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Poměr absorbancí sloužil zároveň jako indikátor čistoty vzorku a měl by být 1,8 a víc.

3.2. Příprava donorové DNA

Pro genomovou modifikaci s použitím CRISPR–cas9 metodiky byl jako templát pro homologní rekombinaci použit donorový konstrukt. Ten se skládal z klonovacího vektoru „pSC A-amp/kan“ (StrataClone) a z inzertu (**Obr. 7**) tvořeného 5' UTR oblastí genu *BRCA1* a přilehlou kódující oblastí. Zhruba v polovině inzertu se nachází místo s analyzovanou sekvenční alterací. Úsek nalevo a napravo od alterace slouží jako homologní ramena pro opravu DNA mechanismem HR. Sekvence rozeznávaná použitým CRISPR-Cas9 se nachází v pravém homologním ramenu v kódující oblasti genu *BRCA1*. V tomto místě jsou do donoru zavedeny synonymní sekvenční alterace zamezující rozpoznání a štěpení donorového konstruktů použitým CRISPR-Cas9. Inzert byl připraven pomocí PCR amplifikace s templátem gDNA izolované z buněk U2 OS. Po naklonování do vektoru byl modifikován metodou site-directed mutagenese.

```

-324                                     -254
AGCTAAGGCTACCACCACCTACCCGGTCAGTCACTCCTCTGTAGCTTCTCTTTCTTGGAGAAAGGAAAAA

-253                                     -183
ACCCAAGGGGTTGGCAGCAATATGTGAAAAAATTCAGAATTTATGTTGTCTAATTACAAAAAGCAACTTCT

-182                                     -112
AGAATCTTTAAAAATAAAGGACGTTGTCATTAGTTCTTTGGTTTTGTATTATTCTAAAACCTTCCAAATCTT

-111                                     -41
AAATTTACTTTATTTTAAAATGATAAAATGAAGTTGTCATTTTATAAACCTTTTAAAAAGATATATATATA

-40                                     -1 +1                                     +31
TGTTTTTCTAATGTGTTAAAGTTCATTGGAACAGAAAGAAATGGATTATCTGCTCTTCGCGTTGAAGAAG

+32                                     +102
TACAAAATGTCATTAATGCTATGCAGAAAATCTTAGAGTGTCCCATCTGGTAAGTCAGCACAAGAGTGTAT

+103                                     +173
TAATTTGGGATTCCTATGATTATCTCCTATGCAAATGAACAGAATTGACCTTACATACTAGGGAAGAAAAA

+174                                     +244
ACATGTCTAGTAAGATTAGGCTATTGTAATTGCTGATTTTCTTAACTGAAGAACTTTAAAAATATAGAAAA

+245                                     +315
TGATTCCTTGTCTCCATCCACTCTGCCTCTCCACTCCTCTCCTTTTCAACACAAATCCTGTGGTCCGGG

+316                                     +386
AAAGACAGGACTCTGTCTTGATTGGTTCTGCACTGGGGCAGGAATCTAGTTTAGATTAAGTGGCATTTTG

+387                                     +430
GCTTTTCTTCCAGCTCTAAAACAAGCTCCATCACTTGAAATGGC

```

Obrázek 7: Část sekvence genu *BRCA1*, která bude vložena do plazmidu pSC A-amp/kan. Wt sekvence nukleotidů (754 bp) izolovaná z buněk U2 OS, která bude modifikována pro účely vytvoření modelového systému. **Modře** je znázorněn iniciační kodón ATG a nukleotidy jsou očíslovány s ohledem k němu. Šedou barvou je zvýrazněna oblast exonu 2, na kterém leží počátek translace.

3.2.1. PCR amplifikace

Inzert pro donorovou DNA byl připraven pomocí PCR amplifikace s použitím gDNA izolované z buněk U2 OS jako templátu. Reakční směs pro PCR byla připravena smícháním 100 ng templátu gDNA, 2.5 µl 10x „LA PCR“ pufru II (TaKaRa), 2.5 µl 25mM MgCl₂ (TaKaRa), 30 pmol forward (5´ – AGCTAAGGCTACCACCACCTAC – 3´) a 30 pmol reverse (5´ – GCCATTTCAAGTGATGGAGCTTG – 3´) primerů, 1.6 µl dNTP's (10 mM – 2.5 mM každého dNTP), 0.1 µl „TaKaRa La Taq“ polymerázy (5 U/ µl), a ddH₂O do výsledného objemu 25 µl. Směs byla poté inkubována v termocykléru, ve kterém byl nastaven následující program: iniciační denaturace 3 minuty při 95 °C.

Následovalo 30 shodných cyklů, které začínaly denaturací, která trvala 30 sekund a probíhala v teplotě 95 °C. Následovalo nasednutí primerů (30 sekund při 60 °C) a prodlužování (1 minuta při teplotě 72 °C). Po těchto cyklech následovala terminální elongace, která trvala 7 minut při 72 °C.

Úspěšnost amplifikace DNA pomocí PCR byla zkontrolována pomocí elektroforézy na 1,5 % agarózovém gelu v prostředí TBE pufru. Separace byla prováděna po dobu 45 minut při konstantním napětí 80 V. Délka PCR produktu byla porovnána s DNA standardem („O'Gene DNA ruler 1 kb“; ThermoFisher Scientific).

3.2.2. Klonování do vektoru („STRATA clone systém“)

Inzert DNA, který byl získán v předchozím kroku (0), byl zaligován do klonovacího vektoru pSC A-amp/kan (StrataClone) pomocí „PCR StrataClone Cloning kit“ (Agilent).

Ligace proběhla následujícím způsobem: Do zkumavek bylo přidáno 3 µl „StrataClone Cloning“ pufru, 2 µl purifikovaného PCR produktu a 1 µl „StrataClone Vector Mix amp/kan“ vektoru. Směs byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Následně byla provedena transformace ligační směsi do chemicky kompetentních buněk „StrataClone SoloPack“ dle postupu popsáního v kapitole 3.1.3 (Transformace plazmidů do kompetentních buněk). Následně byly buňky vysety na agarové misky s LBA a ampicilinem (100 µg/ml). Pro selekci správně zaligovaných konstruktů byl proveden „blue/white screening“. Pro tento účel obsahoval LBA i 40 µg/ml X-gal a 40 µg/ml IPTG. Po inkubaci přes noc při teplotě 37 °C byly vybrány bílé kolonie a zaočkovány do tekutého média. Následně byla provedena izolace plazmidové DNA dle „MINI“ verze preparace, která je popsána v kapitole 3.1.4 (Izolace plazmidové DNA) a kontrola správnosti ligace pomocí sekvenování, které bylo shodné jako sekvenování v kapitole 3.1.5 (Sekvenování).

3.2.3. Site-directed mutagenese

Site-directed mutagenese je metoda založená na principu PCR amplifikace, která dovoluje vytvořit bodové alterace pomocí dvou primerů homologních k cílové sekvenci.

Tyto primery obsahují požadovanou sekvenční alteraci. Jako templát pro PCR amplifikaci byl použit konstrukt v pSC A-amp/kan vektoru viz předchozí krok. Po amplifikaci byl tento templát z reakční směsi odstraněn pomocí štěpení methyl specifickou restriční endonukleázou DpnI (Hutchison *et al.* 1978).

Pro alteraci inzertu byla použita dvou kroková site-directed mutageneze. V prvním kroku byly do kódující oblasti genu BRCA1 rozeznávané použitým CRISPR-Cas9 zavedeny tři různé synonymní alterace. Ty měly činit donor CRISPR-rezistentním a které zároveň v donoru vytvořily místo rozeznávané restriční endonukleázou XhoI pro potřebu následné selekce stabilních klonů. V druhé site-directed mutagenezi byly do takto připraveného konstruktů zavedeny analyzované alterace v nekódující oblasti *BRCA1* před iniciačním kodónem (**Obr. 6**).

Pro PCR reakci bylo použito 10 ng templátu DNA, 15 pmolů forward primeru, 15 pmolů reverse primeru, 1.6 µl směsi dNTP's (2.5mM každého dNTP), 5 µl 10x „LA PCR pufru II“ (TaKaRa), 5 µl 25mM MgCl₂ (TaKaRa) a 1 µl „TaKaRa La Taq“ polymerázy (5 U/ µl). Nakonec byla přidána ddH₂O do výsledného objemu 50 µl.

Sekvence primerů použitých pro **site-directed mutagenezi č.1** – zavedení modifikací neměnicích smysl kodónů (mutované báze jsou v sekvenci primeru **zvýrazněny**):

Sense: 5'-GAAAATCCTCGAGTGCCCCATCTGGTAAG-3'

Antisense: 5'- GATGGGGGCACTCGAGGATTTTCTGCATA -3'

Sekvence primerů použitých pro **site-directed mutagenezi č.2** - zavedení analyzované mutace:

A. **IVS2 -3G>C** dle *in silico* analýz by tato varianta měla snižovat expresi genu *BRCA1* na úrovni proteinu o 20% (Noderer *et al.* 2014).

5'- AGAAA**G**AAATGGAT -3' - wild type (wt) sekvence příslušné části *BRCA1* s vyznačeným **iniciačním kodónem** a **sekvenční alterací**.

sense: 5'- CAGAAACAAATGGATTTATCTGCTC -3'

antisense: 5'- ATCCATTTGTTTCTGTTCCAATGAAC -3'

B. **IVS2 -3GA>TG** – dle *in silico* analýz by tato varianta měla snižovat expresi genu *BRCA1* na úrovni proteinu o 50%.

5'-AGAAA**GAA**ATGGAT-3' - wt sekvence příslušné části *BRCA1* s vyznačeným iniciačním kodómem a **sekvenční alterací**.

sense: 5'- CAGAAA**TG**AATGGATTTATCTGCTC -3'

antisense: 5'- ATCCATT**CA**TTTCTGTTCCAATGAAC -3'

C. **IVS2 -4insA** – sekvenční alterace nejasného klinického významu (VUS) detekovaná v při genetickém vyšetření indikovaných jedinců, bez patogenní mutace v *BRCA1* a *BRCA2* z vysoce rizikových rodin.

5'-AGAAA**A**GAAATGGAT-3' - wt sekvence příslušné části *BRCA1* s vyznačeným iniciačním kodonem a **sekvenční alterací**.

sense: 5'- CAGAAAG**A**AAATGGATTTATCTGCTC -3'

antisense: 5'- ATCCATTT**T**CTTTCTGTTCCAATGAAC -3'

Amplifikace byla provedena v termocykléru dle následujícího PCR programu:

94 °C 3 min – Iniciální denaturace

94 °C 30 sekund, 65 °C 30 sekund, 72 °C 5 minut – Opakováno 5x

94 °C 30 sekund, 65 °C 30 sekund, 72 °C 6 min 45 s – Opakováno 5x

94 °C 30 sekund, 65 °C 30 sekund, 72 °C 8 min – Opakováno 5x

72 °C 10 minut – Terminální elongace

Po amplifikaci byl přímo k reakční směsi přidán 1 µl *DpnI* (20 U/ µl, New England Biolabs) a vzorky byly inkubovány 2 hodiny při 37°C.

Následně byla provedena transformace modifikovaných donorů do chemicky kompetentních buněk TOP10 *E.coli* (Invitrogen™) viz 3.1.3 (Transformace plazmidů do kompetentních buněk). Následovala izolace plazmidové DNA pomocí „MIDI“ verze kitu 3.1.4 (Izolace plazmidové DNA). Správnost každého jednotlivého konstruktů byla ověřena pomocí sekvenování inzertu v jeho plné délce viz 3.1.5 (Sekvenování).

3.3. Tkáňové kultury

3.3.1. U2 OS buňky

Pro vytvoření modelového systému byly použity buňky U2 OS. Jde o stabilní lidské adherentní epiteliální buňky kostní tkáně odvozené od osteosarkomu. Tyto buňky v sobě nesou stabilně inkorporovaný reportér pro stanovení aktivity homologní rekombinací „DR-GFP“ (Direct repeat – green fluorescence protein) (Pierce *et al.* 1999).

3.3.2. Kultivace buněk

U2 OS buňky byly kultivovány za standardních podmínek v teplotě 37 °C za přítomnosti 5 % CO₂. Buňky rostly v kultivačním „DMEM“ médiu (Gibco™), které bylo doplněno 10 % fetálním telecím sérem (FCS F9665; Life Technologies), a 5mg/ml roztoku Glutamin/penicilin/streptomycin (100xGPS 50mg/ml; ThermoFisher). Kultivační médium bylo měněno průběžně každý třetí den.

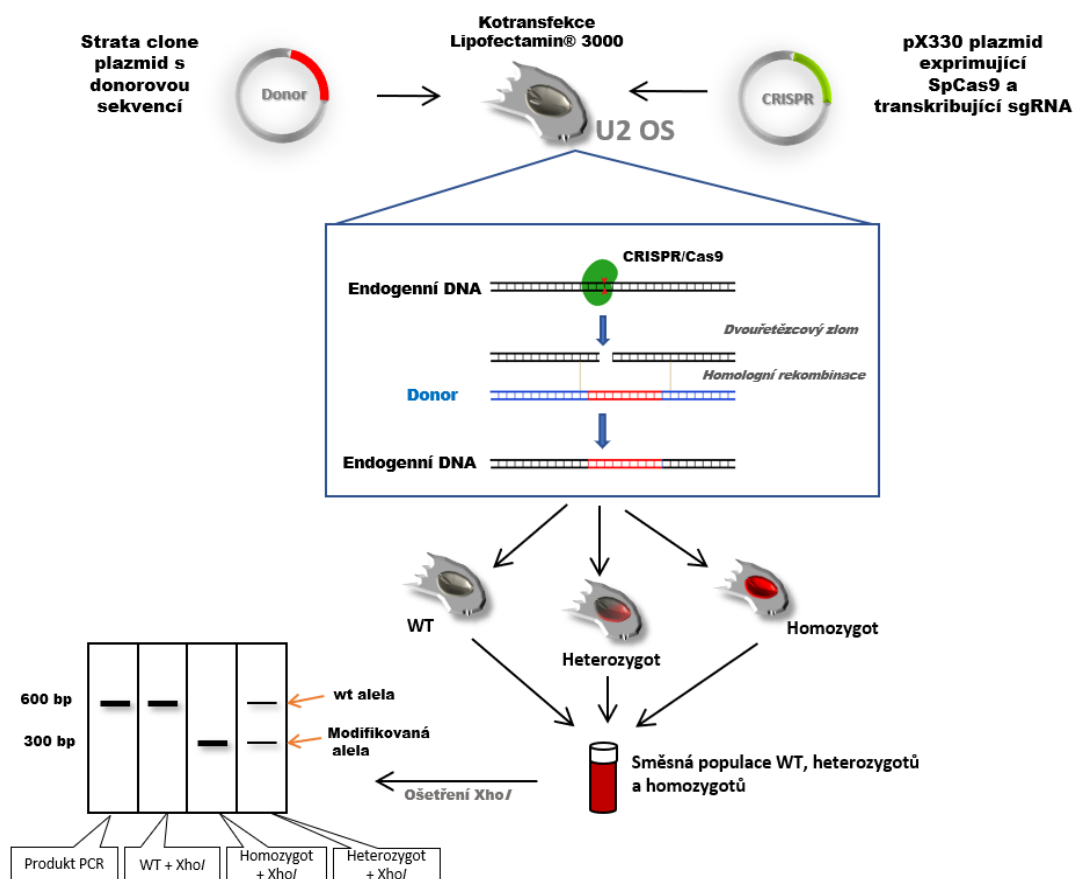
3.3.3. Pasážování buněk

Při dosažení zhruba 80 % subkonfluency buněčné populace byla provedena pasáž buněk. Médium bylo z buněk odstraněno, buňky byly opláchnuty 5 ml fosfátového pufru (PBS) a následně uvolněny od povrchu kultivační nádoby pomocí 1 ml roztoku EDTA-trypsinu (Sigma Aldrich). Buňky byly nejprve inkubovány zhruba 30 sekund, poté byl přebytek trypsinu vylit a inkubace pokračovala při 37 °C až do uvolnění buněk. Poté bylo přidáno 10 ml kultivačního média. Z takto připravené buněčné suspenze byl nasazen 1 ml do nové kultivační nádoby (FL25, Orange Scientific) a bylo přidáno 9 ml kultivačního média. Buňky byly pro experimentální účely používány do maximálně 20. pasáže.

3.4. Příprava klonů se stabilně modifikovaným *BRCA1*

Klony se stabilně modifikovaným genomem byly vytvořeny ko-transfekcí vektoru pSC A-amp/kan (StrataClone) nesoucího alterovaný inzert a vektoru px330Cas9 nesoucího kazetu pro expresi systému CRISPR-Cas9 do buněk U2 OS. Po ko-transfekci mělo dojít k expresi sgRNA, která vede protein cas9 k cílové sekvenci. Endonukleáza

cas9 indukuje sekvenčně specificky dvouřetězcový zlom DNA, který může být opraven mechanismem homologní rekombinace s využitím templátu v podobě alterované sekvence na donorovém konstrukt (Obr. 8). Funkčnost systému bude ověřena restriční analýzou směsných populací, která bude vizualizována na elektroforéze.



Obrázek 8: Metodický postup pro vytvoření stabilně modifikovaných homozygotních a heterozygotních klonů pro analyzovanou variantu genu BRCA1. Ko-transfekce konstruktů px330Cas9 nesoucího CRISPR-Cas9 a pSC A-amp/kan konstruktů nesoucího modifikovanou donorovou sekvenci byla provedena pomocí Lipofectamin® 3000 do buněk U2 OS. Po expresi sgRNA a cas9 byla přítomnost vyšetřované sekvenční alterace stanovena pomocí PCR amplifikace daného úseku s následnou restrikcí pomocí XhoI. Výsledky budou vyhodnoceny pomocí gelové elektroforézy. Ze směsné populace obsahující modifikované buňky budou jednotlivé klony selektovány ve formě „single cell“ kolonií. Přítomnost sekvenční alterace v nich bude potvrzena přímo pomocí Sangerova sekvenování.

3.4.1. Transfekce

Transfekce buněk U2 OS byla prováděna pomocí chemické transfekčního kationického činidla „Lipofectamine 3000“ (ThermoFisher Scientific).

Do 24-jamkové kultivační destičky byly nasazeny buňky v množství 2×10^5 buněk na jamku. Buňky byly pěstovány za standardních kultivačních podmínek do dosažení 75 % subkonfluence. Dvě hodiny před transfekcí bylo kultivační médium nahrazeno transfekčním médiem „Opti-MEM®“ (Gibco) bez přídavku séra a antibiotik. Transfekční směs byla připravena smícháním „Lipofectaminu 3000“ naředěného v 50 μ l „Opti-MEM®“ média (1.5 μ l „Lipofectaminu 3000“ na každý 1 μ g DNA) a DNA (2 μ g px330Cas9 a 2 μ g pSC A-amp/kan s donorovou sekvencí – pro potřebu genové modifikace; 2 μ g pSceI a 0.2 μ g dsRed pro potřebu DR-GFP eseje) naředěné v 50 μ l „Opti-MEM®“ média. Takto připravená směs byla inkubována 5 minut při pokojové teplotě a následně přidána k buňkám. Transfekce probíhala 48 hodin. Po ukončení transfekce byly buňky zkontrolovány v optickém mikroskopu, transfekční médium bylo odsáto, buňky byly opláchnuty 1x PBS a kultivovány po dobu 24 hodin za standardních kultivačních podmínek.

3.4.2. Ověření funkčnosti navrženého systému

Ověření funkčnosti navrženého systému pro genomovou modifikaci bylo u směsné populace transfekovaných buněk provedeno pomocí „Surveyor assay“. Toto ověření je založeno na prokázání přítomnosti donorové DNA (modifikovaného inzertu) v genomu buněk modelového systému pomocí PCR amplifikace modifikovaného úseku genu *BRCAl* a následné restriční analýzy PCR produktu. Za směsnou populaci buněk je v tomto případě považována populace buněk po ko-transfekci donorovým plazmidem, nesoucím jednu (IVS2 -3GA>TG, IVS2 -3G>C, IVS2 -4insA) z analyzovaných modifikací v nekódující sekvenci, a px330Cas9 konstruktem. Donorová sekvence obsahuje unikátní restriční místo *XhoI*. U buněk, které ve své genomové DNA mají zavedenou modifikaci, tudíž dojde ke štěpení PCR produktu při styku s restriční endonukleázou *XhoI*. Jako pozitivní kontrola transfekce byla paralelně provedena transfekce buněk GFP (Green fluorescent protein) plazmidem. S následným vyhodnocením pomocí fluorescenční mikroskopie. Jako negativní kontrola byla provedena transfekce buněk pouze donorovým vektorem pSC-A – bez ko-transfekce s vektorem px330Cas9.

Po transfekci a před selekcí klonů byla ze směsné populace izolována gDNA. Ta byla následně použita jako templát pro PCR amplifikaci a restriční analýzu. Selekcce

klonů byla provedena pouze v případě pozitivního výsledku ověření funkce navrženého systému.

3.4.2.1. Izolace gDNA

Izolace gDNA byla provedena pomocí „Wizard® Genomic DNA Purification Kit“ (Promega). Postup je popsán v následujícím textu.

Buňky byly nejdříve uvolněny z Petriho misek trypsinem a byly přeneseny do zkumavek. Trypsin byl inaktivován přidáním kultivačního média DMEM (Gibco™) s 10 % fetálním telecím sérem (FCS F9665; Life Technologies). Médium bylo odstraněno po 10-ti minutové centrifugaci při rychlosti $750 \times g$. Peleta buněk byla opláchnuta PBS, načež byla zopakována centrifugace při rychlosti $750 \times g$.

K peletě buněk bylo do zkumavek přidáno 300 μ l lyzačního roztoku („nuclei lysis solution;“ Promega). Pomocí pipety byl roztok spolu s buňkami promícháván, dokud nebyla směs homogenní. Dále bylo k lyzátu přidáno 100 μ l precipitačního roztoku („protein precipitation solution;“ Promega). Zkumavky byly 20 sekund vortexovány a následně 10 minut inkubovány při teplotě 4 °C. Po inkubaci byly zkumavky 10 minut centrifugovány rychlostí $10\,000 \times g$ při 4 °C. Supernatant, ve kterém byla DNA, byl přenesen do nových zkumavek a bylo k němu napipetováno 300 μ l isopropanolu. Pro vysrážení DNA se se zkumavkami 30 sekund otáčelo v ruce. Zkumavky byly 2 minuty centrifugovány rychlostí $10\,000 \times g$ při pokojové teplotě. Po odsátí supernatantu bylo k peletu obsahujícího DNA přidáno 600 μ l 70 % ethanolu. Zkumavky byly centrifugovány za identických podmínek jako při předchozí centrifugaci. Poté, co byly zkumavky zbaveny ethanolu, byly ponechány pro úplné vysušení na vzduchu. DNA byla nakonec rozpuštěna ve 40 μ l rehydratačního roztoku („rehydration solution;“ Promega).

3.4.2.2. Amplifikace DNA pomocí PCR

Požadovaná sekvence DNA byla amplifikována pomocí PCR za stejných podmínek jako v kapitole 3.1.5 (Sekvenování). Jako templát byla použita gDNA izolovaná ze směsné populace buněk.

3.4.2.3. Štěpení restrikční endonukleázou

Pomocí restrikční endonukleázy *XhoI* bylo provedeno štěpení pro kontrolu zavedení modifikované části genu *BRCA1* do gDNA buněk U2 OS.

V čistých zkumavkách byla připravena reakční směs, která se sestávala z: 1 µl 10x „CutSmart®“ pufru (New England Biolabs), 1 µl *XhoI* enzymu (20 U/ µl, New England Biolabs) a 6 µl PCR produktu z předchozího kroku. Do výsledného objemu 10 µl byla přidána ddH₂O. Restrikční reakce probíhala v termocykléru při teplotě 37 °C 90 minut.

3.4.2.4. Vyhodnocení restrikce pomocí elektroforézy

Výsledek restrikční reakce byl vyhodnocen pomocí elektroforézy na 1 % agarózovém gelu s obsahem interkalačního barviva „GelRed“ (Biotium) v prostředí TBE pufru (tris borát EDTA). Vzorky z restrikční reakce byly smíchány s 2 µl vzorkového pufru „Gel Loading Dye Purple 6x“ (New England Biolabs) a aplikovány do jamek na gelu. Jako marker byl použit „O'GeneRuler 1 kb DNA Mix“ (Thermo Scientific). DNA byla separována 60 minut za konstantního napětí 90 V. Vizualizace DNA byla provedena pod UV světlem.

3.4.3. Selektce klonů se stabilně zavedenými alteracemi

Po transfekci byly směsné populace buněk U2 OS naředěny na koncentraci 100 buněk/10 ml kultivačního média a následně vysety na kultivační misky P100 (Orange Scientific). Buňky byly pěstovány 3 týdny za standardních kultivačních podmínek. Jednotlivé „single-cell“ kolonie byly poté přeneseny do jamek na 96-ti jamkové destičce. Dále byla z každého získaného klonu izolována gDNA. Přítomnost analyzované alterace byla stanovena pomocí restrikční analýzy a postup byl identický s postupem v kapitole 3.4.2 (Ověření funkčnosti navrženého systému). U klonů s pozitivním výsledkem restrikční analýzy bylo navíc provedeno sekvenování v plné délce modifikované oblasti genu *BRCA1*. Vybrány byly klony, které vykazovaly přítomnost alespoň jedné mutované alely.

3.5. Kvantifikace BRCA1 na úrovni mRNA

Po přípravě modelového systému byl charakterizován vliv, který mají modifikace genu *BRCA1* na transkripci, translaci a na aktivitu HR.

3.5.1. Izolace RNA

RNA byla z buněk izolována dle kitu „RNease Mini Kit“ (QIAGEN®). Buňky byly nejdříve uvolněny z kultivační nádoby trypsinem a přeneseny do zkumavek. Trypsin byl inaktivován přidáním kultivačního média se sérem. Médium bylo odstraněno 10-ti minutovou centrifugací při rychlosti $750 \times g$. Peleta buněk byla opláchnuta PBS, načež byla zopakována centrifugace při rychlosti $750 \times g$. K peletě buněk bylo přidáno 350 μ l „RLT“ (QIAGEN®) pufru s přidavkem β -Mercaptoethanolu. Následně bylo k lyzátu přidáno 350 μ l 70 % ethanolu, roztok byl pomocí pipety promíchán a objem 700 μ l byl přenesen do „RNease spin“ (QIAGEN®) kolonky umístěné v 2 ml zkumavce. Dále byly kolonky se zkumavkami centrifugovány rychlostí $8000 \times g$ 15 sekund, poté byl lyzát vylit. Kolonky byly promyty 700 μ l pufru „RW1“ (QIAGEN®) a proběhla centrifugace za stejných podmínek. Poté bylo přidáno 500 μ l pufru „RPE“ (QIAGEN®), opakovala se shodná centrifugace a lyzát byl znovu odstraněn. Poté bylo do kolonky podruhé přidáno 500 μ l pufru „RPE“ (QIAGEN®). Po přidání došlo k centrifugaci při rychlosti $8000 \times g$ po dobu 2 minut. Po tomto kroku byla tekutina ve zkumavce odstraněna a kolonka byla umístěna do nové zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 40 μ l vody bez RNázy a zkumavky byly 1 minutu centrifugovány rychlostí $8000 \times g$.

3.5.2. Stanovení množství RNA

Množství RNA bylo stanoveno měřením na přístroji NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer při vlnové délce 260 nm a 280 nm.

3.5.3. Příprava cDNA

Pro odstranění možné kontaminace vzorku RNA bylo nejprve provedeno ošetření DNázou. Celkové množství 2 μ g totální RNA byly naředěny ddH₂O do výsledného objemu 9.6 μ l. Následně bylo přidáno 1.2 μ l 10x „DNase“ pufru a 1.2 μ l „DNase I“

(Finnzymes; 10U/μl). Směs byla inkubována 30 minut v teplotě 37 °C. Po této době bylo přidáno 1.2 μl EDTA a roztok byl inkubován 10 minut při teplotě 65 °C kvůli inaktivaci DNázy.

Syntéza cDNA (komplementární DNA) byla provedena pomocí reverzní transkriptázy „SuperScript III“ (Invitrogen). K 13.2 μl reakční směsi z předchozího kroku (ošetření DNázou) bylo přidáno 0.5 μl směsi náhodných hexanukleotidů (50μM), 0.8 μl dNTP's (10mM; 2.5 mM každého). Tato směs byla inkubována 10 minut při 65 °C a poté byla zchlazena na ledu. Následně k ní bylo přidáno 1 μl 100 mM DTT, 4 μl „5X First strand Super Script“ pufru a 0.5 μl „Super Script III“ (200 U/μl). Směs byla poté inkubována 5 minut při teplotě 25 °C, 50 minut při 50 °C a 15 minut při 70 °C.

3.5.3.1. Kvantitativní qRT-PCR

Do reakční směsi bylo přidáno 0.1 μg cDNA, která sloužila jako templát pro qRT-PCR, 0.5 μM každého primeru a 5μl „LightCycler 480 SYBR Green I Master mix.“ Tato směs byla následně inkubována v termocykléru, kde proběhlo 50 cyklů, které se skládaly z těchto fází: 95 °C po dobu 10 s, 70°C po dobu 10 s a 72°C po dobu 10 s. *BRCA1*-specifické primery (5'-AGAGTGTCCCATCTGTCTGGAGTTG-3' a 5'-GGACACTGTGA AGGCCCTTTCTTC-3') byly cíleny do kódující sekvence *BRCA1* (mRNA: 185 bp - 304 bp). Pro relativní kvantifikaci byly použity dva referenční housekeeping geny *β2-microglobulin* (B2M; SuperArray) a *glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza* (GAPDH; 5'-ATGTCTGGTAACGGCAATGCGG-3' a 5'-TGTCCTGTGGTGGACATAGC-3'). Výsledky qRT-PCR byly analyzovány na LightCycler software (Roche). Hodnoty „crossing points“ (CPs) a amplifikační úspěšnost byly po každé reakci vyhodnoceny. Měření byly dva biologické vzorky v tripletech. Exprese *BRCA1* byla normalizována za pomoci exprese GAPDH a B2M softwarem qREST-2005.

3.6. Stanovení množství proteinu BRCA1

3.6.1. Izolace proteinu

Buňky byly nejdříve uvolněny z kultivační nádoby trypsinem a přeneseny do zkumavek. Trypsin byl inaktivován přidáním kultivačního média se sérem. Médium bylo

odstraněno centrifugací při rychlosti $750 \times g$ po dobu 10 min. Peleta buněk byla opláchnuta PBS, načež byla zopakována centrifugace při rychlosti $750 \times g$. K peletě buněk bylo přidáno 40 μl „cOmplete™ Lysis-M“ roztoku (Roche) s přidavkem inhibitorů proteáz a protein fosfatáz „cOmplete Mini Protease Inhibitor cocktail I“ (Roche). Buňky byly rozsuspendovány pipetou a inkubovány 20 minut na ledu. Nerozpuštěné části byly z lyzátu odstraněny centrifugací při $14\,000 \times g$ po dobu 10 min při $4\text{ }^\circ\text{C}$. U vzorků byla stanovena koncentrace a byly do použití skladovány v teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

3.6.2. Stanovení koncentrace proteinů pomocí BCA

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí BCA eseje (ThermoScientific). Principem stanovení je měření absorbance barevného komplexu v roztoku proteinů. Barevný komplex vzniká redukcí Cu^{2+} na Cu^+ peptidovou vazbou proteinů. Měďné ionty jsou následně chelátovány bicinchoninikovou kyselinou (BCA) a společně vytváří komplex fialové barvy (Smith *et al.* 1985).

Množství proteinů v roztoku je vyhodnocováno na spektrofotometru při vlnové délce 562 nm. Ve zkumavce bylo smícháno 25 μl vzorku proteinu s 200 μl pracovního roztoku BCA. Směs byla promíchána a inkubována 30 minut při $37\text{ }^\circ\text{C}$. Poté byla změřena absorbance pomocí přístroje NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer. Koncentrace vzorku byla odečtena z kalibrační křivky připravené ředěním standardu sérového albuminu. Jako blank byl použit pracovní roztok BCA bez přidávaných proteinů. Stanovení koncentrace bylo prováděno v tripletech.

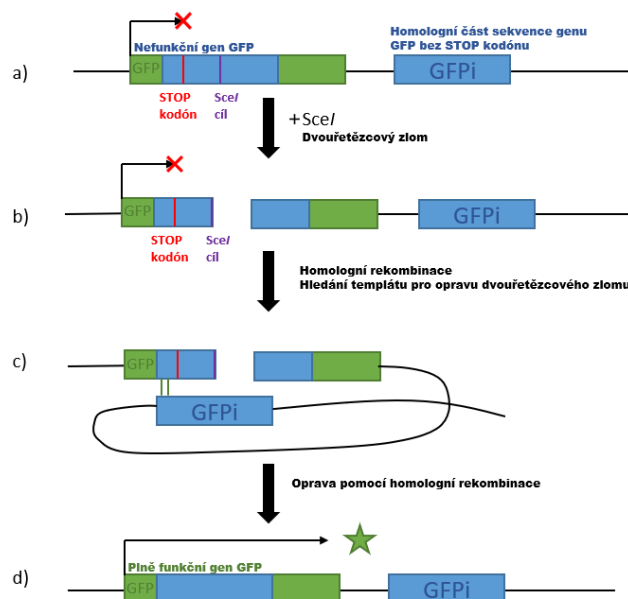
3.6.3. ELISA

Protein BRCA1 byl kvantifikován pomocí kitu „ELISA“ (Cloud-Clone Corp). Do každé misky bylo přidáno 100 μl standardu, blanku, nebo vzorků v množství odpovídajícímu 10 μg celkového proteinu. Destička se vzorky byla následně 1 hodinu inkubována při teplotě $37\text{ }^\circ\text{C}$. Poté byl roztok odstraněn pipetou a bylo přidáno 100 μl roztoku „Detection reagent A“ (Cloud-Clone Corp). Destička byla znovu inkubována 1 hodinu při $37\text{ }^\circ\text{C}$. Poté byly jednotlivé jamky v destičce promyty 350 μl roztoku „Wash solution“ (Cloud-Clone Corp). Celkově byl oplach proveden třikrát. Po promytí bylo přidáno 100 μl roztoku „Detection reagent B“ (Cloud-Clone Corp) a vzorky byly

inkubovány 30 min při 37 °C. Po inkubaci bylo provedeno promytí 5x 350 µl roztoku „Wash solution“. Po vymytí bylo ke vzorkům přidáno 90 µl roztoku „Substrate solution“, a následovala 10-ti minutová inkubace při 37 °C. Do směsi bylo přidáno 50 µl roztoku „Stop solution“ (Cloud-Clone Corp) a po promíchání byla změřena absorbance jednotlivých vzorků spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm.

3.7. Analýza aktivity homologní rekombinace pomocí „DR-GFP assay“

Aktivita homologní rekombinace byla stanovena pomocí „DR-GFP assay“, který je založen na dvou kazetách reporterového systému stabilně integrovaných v genomu buněk U2 OS (**Obr. 9**). První kazeta obsahuje sekvenci genu *GFP* (Green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein), s předčasným terminačním kodónem, který brání expresi plně funkčního proteinu GFP. Zároveň sekvence obsahuje unikátní místo, které je rozeznáváno restriční endonukleázou *SceI*. Na druhé kazetě se nachází neúplná sekvence genu *GFP* homologní k sekvenci *GFP* v první kazetě. Tato druhá kazeta neobsahuje předčasný terminační kodon ani místo rozeznávané *SceI*. Po transfekci expresního plazmidu obsahujícího gen *SceI* dojde k indukci dvouřetězcového zlomu DNA v první kazetě. Pokud je takto vygenerovaný dvouřetězcový zlom opraven homologní rekombinací dle sekvence vedlejší kazety, dojde k náhradě předčasného terminačního STOP kodónu v první kazetě a expresi plně funkčního GFP. Aktivita homologní rekombinace je následně stanovena jako celkový počet GFP pozitivních buněk vztažených k vnitřní kontrole. Jako vnitřní kontrola byl použit expresní vektor dsRed-C1, kterým byly buňky kotransfekovány spolu s p*SceI* shodným postupem, jako v kapitole 3.4.1 (Transfekce) (Puget *et al.* 2005).



Obrázek 9: Princip stanovení aktivity homologní rekombinace pomocí reporterového „DR-GFP assay“. Do buněk modelového systému U2 OS je stabilně inkorporovaná kazeta DR-GFP. První část kazety (vlevo) kóduje GFP a obsahuje nesmyslnou (non-sense) mutaci vedoucí ke vzniku předčasného terminačního kodónu, který brání produkci GFP proteinu, a dále místo rozeznávané SceI endonukleázou. Druhá část kazety, GFPi, (vpravo) je homologní k první kazetě, obsahuje pouze část GFP bez iniciačního kodónu a nese v sobě předčasný stop kodón ani místo, které rozeznává SceI. Obě kazety jsou od sebe odděleny 1009 bp spaceru (a). Po transfekci SceI dojde k jeho expresi a SceI indukuje sekvenčně specificky dvouřetězcový zlom DNA v první kazetě (b). Ten je opraven pomocí homologní rekombinace a jako templát je použita druhá kazeta (c). Pokud reparace proběhla pomocí homologní rekombinace je uvolněna exprese plně funkčního GFP (d), který se následně stanoví pomocí průtokové cytometrie.

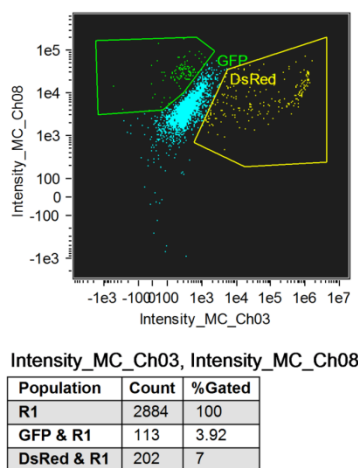
3.7.1. Příprava buněk pro „DR-GFP assay“

Buňky U2 OS se stabilně zavedeným DR-GFP byly kultivovány v 6-ti destičkách a ko-transfekovány expresním plazmidem nesoucím SceI a dsRed-C1 jako vnitřní kontrolou pomocí „Lipofectaminu 3000“ (Life Technologies).

Buňky byly nejdříve uvolněny z kultivační nádoby trypsinem a přeneseny do zkumavek. Trypsin byl inaktivován přidáním kultivačního média se sérem. Médium bylo odstraněno centrifugací při rychlosti $750 \times g$ po dobu 10 min. Peleta buněk byla opláchnuta PBS, načež byla zopakována centrifugace při rychlosti $750 \times g$. Nakonec byly buňky rozsuspendovány v 150 μ l PBS na koncentraci 300 000 buněk/ml a okamžitě analyzovány na FACS.

3.7.2. Analýza „DR-GFP assay“

Aktivita HR byla vyhodnocena výpočtem procent GFP a DsRed, který sloužil jako vnitřní kontrola, pozitivních buněk. Byl použit průtokový cytometr “AMNIS ImageStream X mkII,” který je vybaven lasery, které emitují záření s vlnovými délkami 375, 405, 488, 561 a 642 nm (Amnis - EMD Millipore, Seattle WA, USA). Pro získání vzorků byl použit software „INSPIRE® software“ (číslo: 780-01286-01 Rev: B, Amnis - EMD Millipore). Pro analýzu sesbíraných dat byl použit software „IDEAS ANALYSIS“ (v.6.1, Amnis - EMD Millipore). Pro kalibraci tohoto nástroje byl denně používán roztok “The SpeedBead ImageStream X calibration reagent“ společně s „ASSIST“ automatickým kalibračním modulem; Amnis - EMD Millipore). Emisní signál z DsRed byl detekován kanálem 3 (excitační laser 561 nm (20 mW) / emisní vlnová délka: 560-595 nm (537/65) a emisní signál GFP byl detekován kanálem 8 (excitační laser 405 nm 120 mW / emisní vlnová délka: 505-570 nm (577/35)). Kanály 1 a 9 byly použity pro sběr světelného signálu (zvětšení 20x). Pro rozlišení dubletů buněk byl vytvořen dot-plot s parametry „poměr intenzity“ a „poměr plochy“ (Obr. 10). Pro přesné vlastnosti výkonu laseru byl použit dot plot s parametry „Raw Max Pixel_Ch 8“ a „Raw Max Pixel_Ch 3“. Buňky pozitivní pouze na DsRed, či pouze na GFP, byly “gatovány” využitím dot plotu s parametry „Intensity_Ch 6“ a „Intensity_Ch 03”.



Obrázek 10.: Aktivita HR byla stanovena v buňkách U2 OS pomocí průtokové cytometrie. Aktivita HR byla určena jako množství GFP a dsRed pozitivních buněk pomocí FACS. Buňky U2 OS bez modifikací v BRCA1 byly sloužily jako kontrola. Pozadí fluorescence bylo určeno v buňkách U2 OS bez SceI-indukovaných DSB. Aktivity HR a NHEJ v netransfekovaných buňkách byly považovány za to samé. Data byla nasbírána ze tří separátních biologických replikátů, které byly v tripletech \pm standardní odchylka; statistická signifikance.

4. Výsledky

4.1. Konstrukce modelového systému pro funkční *in vitro* evaluaci studovaných sekvenčních alterací

4.1.1. Příprava systému pro cílenou genovou manipulaci

4.1.1.1. CRISPR-Cas9

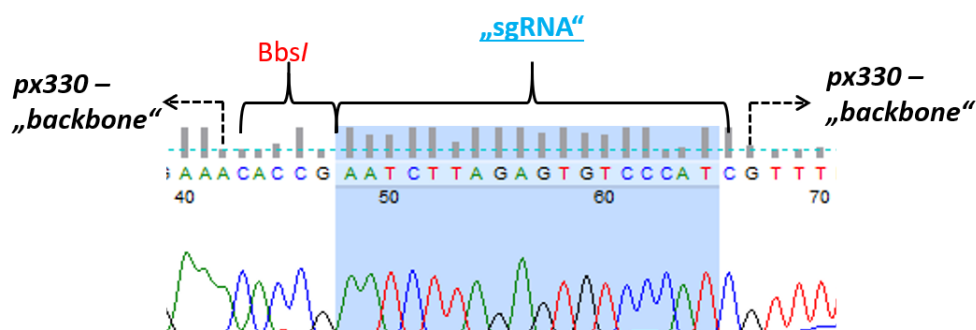
Pomocí softwaru „CHOP CHOP“ byla navržena sgRNA nejvhodnější pro plánovanou genovou modifikaci. Hodnota jejího „MIT specificity score“ byla 82, přičemž maximální hodnota tohoto skóre je 100 (Haeussler *et al.* 2016). Předpokládaná efektivita navržené sgRNA dle Doencheho je 54/100 (Doench *et al.* 2016). Množství míst mimo studovanou oblast genu BRCA1 „off-target“, kam by mohla být navržená sgRNA cílena, je 0 (**Obr.** 11). Zvolená sekvence sgRNA bude indukovat štěpení DNA za místem c.80T.

Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes 🚫 + Variants 🚫 <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A- 🚫	MIT Specificity Score 🚫	CFD Spec. score 🚫	Predicted Efficiency 🚫 Show all scores Doench '16 Mor.-Mateos		Outcome Out-of-Frame Lindel		Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM 🚫
AAATCTTAGAGTGTCCCATC TGG Enzymes: BclI Cloning / PCR primers	82	94	54	41	65	76	0 - 0 - 2 - 12 - 89 0 - 0 - 0 - 0 - 2

Obrázek 11: Výsledky predikce specifity a efektivit navržené sgRNA. „Guide sequence + PAM“ uvádí sekvenci oligonukleotidu pro sgRNA i s PAM, který součástí oligonukleotidu není. Hodnoty „MIT specificity score“ a „CFD specificity skóre“ jsou hodnoty charakterizující množství „off-target“ cílů v genomu. Čím vyšší hodnotu tato čísla nabývají, tím je množství „off-target“ nižší a sgRNA jsou specifitější. Maximální hodnotou obou skóre je 100. Dále je určena „predicted efficiency“, tedy předvídaná efektivita navržené sgRNA, která je 54 dle studie Doenche a 41 dle studie Mor-Matea. Poslední sloupec znázorňuje „off-target“ cíle pro 0-4 „mismatch“. Navržená sgRNA nemá žádný přesný „off-target“ ani pokud by šlo o 2 mismatche. Výsledek je generován pomocí programu CHOP CHOP.

Následně byl navržený oligonukleotid, který v sobě nesl také místo rozeznávané BbsI restriční endonukleázou pro vložení do vektoru. Tento oligonukleotid byl zaklonován do savčího expresního vektoru px330Cas9 (8484 bp bez oligonukleotidu).

Konstrukt byl pro namnožení transformován do kompetentních buněk Top10. Přítomnost oligonukleotidu sgRNA v konstruktu px330Cas9 byla ověřena pomocí Sangerova sekvenování (**Obr. 12**)



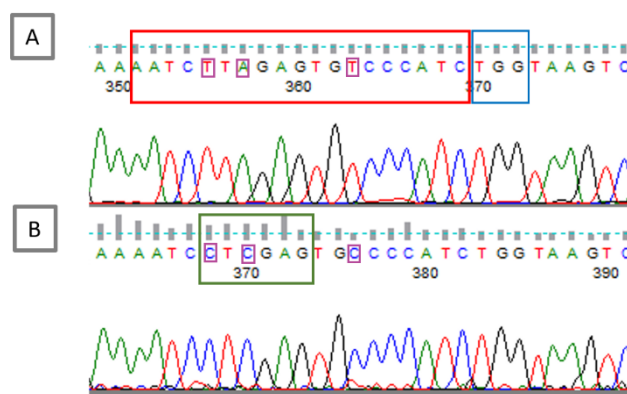
Obrázek 12: Výřez chromatogramu ze Sangerova sekvenování sekvence nukleotidů v CRISPR konstruktu px330Cas9. Z výřezu je patrné, že do expresního CRISPR vektoru px330Cas9 (px330-„backbone“, bez zvýraznění) byl úspěšně vložen navržený oligonukleotid DNA dlouhý 24 bp (zvýrazněn modře) jehož přepisem vznikne sgRNA. Součástí oligonukleotidu je také sekvence rozeznávaná restriční endonukleázou BbsI, která je na obrázku znázorněna.

Podařilo se navrhnout oligonukleotid kódující „sgRNA“ o délce 24 bp, který je cílen do místa BRCA1 vhodného pro plánovanou genovou manipulaci. Tato navržená sgRNA má dle dostupných programů vysokou efektivitu indukce sekvenčně specifického dvouřetězcového zlomu DNA a současně minimální „off-target“. S využitím restrikce pomocí endonukleázy druhého typu BbsI a následnou ligací pomocí T7 DNA ligázy se podařilo zkonstruovat expresní vektor px330Cas9, který obsahuje navrženou sgRNA.

4.1.1.2. Příprava donorové sekvence

S ohledem na dostupné informace z literatury, kde je jako optimální délka homologních ramen pro CRISPRem zprostředkovanou genomovou modifikaci udáváno 350 nukleotidů (Ran *et al.* 2013), byl navržen donor, který obsahuje část promotoru genu *BRCA1* s prvním kódujícím exonem (exon 2) a částí následujícího intronu o celkové délce 754 bp. Místo rozeznávané navrženým CRISPRem se přitom nachází v kódující části exonu 2 a rozděluje celý donor na zhruba stejně dlouhá homologní ramena. Navržený donor byl nejprve amplifikován pomocí PCR s využitím gDNA izolované z buněk U2 OS jako templát a následně zaklonován do vektoru pSC A-amp/kan (StrataClone). Do

tohoto inzertu byly následně zavedeny metodou site-directed mutageneze modifikace umožňující plánovanou genomovou manipulaci. Nejdříve byl do donoru v místě rozpoznávaném navrženým CRISPRem zavedeny synonymní sekvenční alterace, které mají za úkol znemožnit štěpení donoru použitým CRISPRem. Tyto modifikace byly: c.64 T>C p.22Leu>Leu; c.66 A>C p.22Leu>Leu; c.72 T>C p.24Cys>Cys. Tyto alterace zároveň vytvořily v donoru unikátní místo rozeznávané restriční endonukleázou XhoI (CTCGAG c.64 až c.69), která inzert rozštěpí na dva různě dlouhé fragmenty, 366 bp a 388 bp. Smyslem vytvoření tohoto restričního místa je identifikace klonů buněk modifikovaných pomocí navrženého CRISPR/donor systému. Pomocí sangerova sekvenování bylo ověřeno, že tato site-directed mutageneze byla úspěšná (**Obr.** 13).

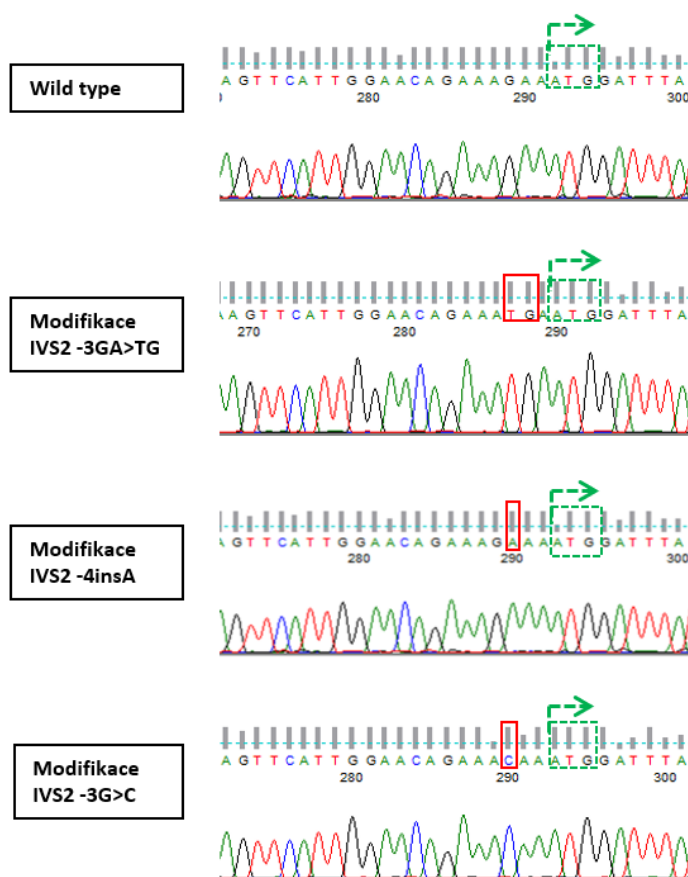


Obrázek 13: Zavedení synonymních sekvenčních alterací do donorové sekvence. A. *Výřez chromatogramu ze Sangerova sekvenování donoru, která zobrazuje část sekvence genu BRCA1 bez zavedených modifikací. Červeným rámečkem je vyznačena cílová sekvence pro sgRNA navrženého CRISPR-Cas9. Modrým rámečkem je označena sekvence PAM. Malými fialovými rámečky jsou označeny báze, které budou modifikovány. B.* *Výřez chromatogramu ze Sangerova sekvenování části donoru, která byla pomocí site-directed mutageneze. Fialovými rámečky jsou označeny báze, které byly modifikovány c.64T>C; c.66A>C; c.72T>C. Zeleným rámečkem je označené nově vytvořené unikátní místo rozeznávané XhoI.*

Do takto modifikovaného donoru byla následně do oblasti před iniciačním kodómem zavedena vždy jedna ze třech různých sekvenčních alterací (IVS2 -3GA>TG; IVS2 -4insA; IVS2 -3G>C). Sekvenční alterace IVS2 -3GA>TG a IVS2 -3G>C byly vybrány na základě jejich v literatuře popsaného negativního efektu na expresi BRCA1 na úrovni translace. Podle dostupných zdrojů, by tyto varianty měly statisticky významně snižovat koncentraci proteinu BRCA1 a v naší práci tak budou využity ke stanovení

závislosti aktivity homologní rekombinace na koncentraci BRCA1. Sekvenční alterace IVS2 -4insA byla opakovaně detekována v průběhu genetického vyšetření pacientů s vysokým rizikem vzniku karcinomu prsu. Z genetického vyšetření zároveň vyplynulo, že pacienti nemají žádnou patologickou mutaci ve známých predispozičních genech. Tato varianta, která se nachází v důležité konsensní regulační oblasti (Kozákové sekvence) by potenciálně mohla negativně ovlivnit expresi BRCA1. Tato varianta bude v práci využita k ověření vhodnosti navrženého modelového systému pro funkční charakterizaci sekvenčních variant v nekódujících oblastech BRCA1.

Přítomnost požadovaných sekvenčních alterací byla ověřena Sangerovým sekvenováním konstruktů (**Obr. 14**)



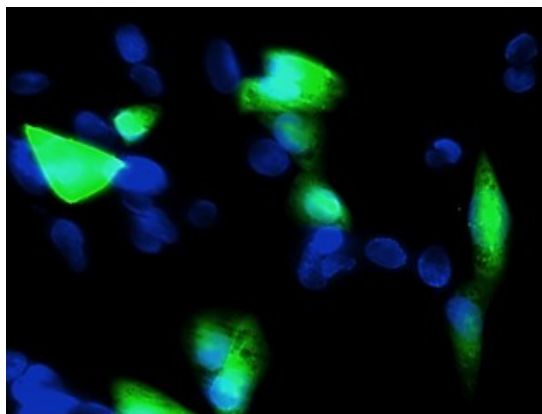
Obrázek 14: Výřezy chromatogramů získaných ze Sangerova sekvenování donorového vektoru. Výsledky ze Sangerova sekvenátoru, které sloužily pro kontrolu zavedení studovaných sekvenčních alterací provedených metodou site-directed mutagenese do donorového konstruktů pSC A-amp/kan. Červeným rámečkem jsou označeny nukleotidy, které byly modifikované a zeleným přerušovaným rámem jsou označeny iniciační kodóny ATG.

Do vektoru pSC A-amp/kan byl úspěšně vložen inzert (754 bp) izolovaný z U2 OS buněk, který pochází z genu *BRCA1* a který obsahoval část kódující i nekódující sekvence. Následně se podařilo v inzertu vytvořit první site-directed mutagenézí modifikace neměňící smysl kodónů v kódující části sekvence. Do inzertu v konstruktu byla úspěšně zavedena druhou site-directed mutagenézí jedna ze tří typů modifikací v nekódující sekvenci. Podařilo se připravit každou z donorových sekvenčních alterací (IVS2 -3GA>TG; IVS2 -4insA; IVS2 -3G>C) pro plánovanou genomovou modifikaci.

4.1.2. Izolace klonů U2 OS se stabilně cíleně modifikovaným genomem

4.1.2.1. Stanovení efektivity transfekce

Pro zjištění efektivity transfekce pomocí „Lipofectamine 3000“ (ThermoFisher Scientific) byly buňky U2 OS transfekovány expresním plazmidem produkujícím GFP. Funkčnost transfekce byla zkontrolována pomocí fluorescenční mikroskopie, kdy byla jádra buněk zároveň obarvena fluorescenční barvou DAPI (**Obr. 15**).



Obrázek 15: Kontrola funkčnosti transfekce do buněk U2 OS: Buňky U2 OS byly tranzientně transfekované plazmidem produkujícím GFP, zafixovány paraformaldehydem a obarvené barvou **DAPI**. **Zeleně** září buňky, do kterých byl transfekován plazmid a které produkují GFP. Čistě modře jsou obarveny buňky, které nejsou transfekovány. Z obrázku je patrné, že efektivita transfekce je relativně vysoká. Následnou analýzou pomocí průtokové cytometrie byla stanovena na 25 %.

Efektivita transfekce byla následně vyhodnocena pomocí průtokové cytometrie, kdy jako negativní kontrola byly použity netransfekované (bez přidavku „Lipofectamine 3000“) buňky U2 OS. V konfiguraci 2×10^5 U2 OS buněk o sub-konfluenci 75 % (ve 24 jamkové destičce) pomocí „Lipofectamine 3000“ použitím 1 μ g DNA / 1.5 μ l „Lipofectamine

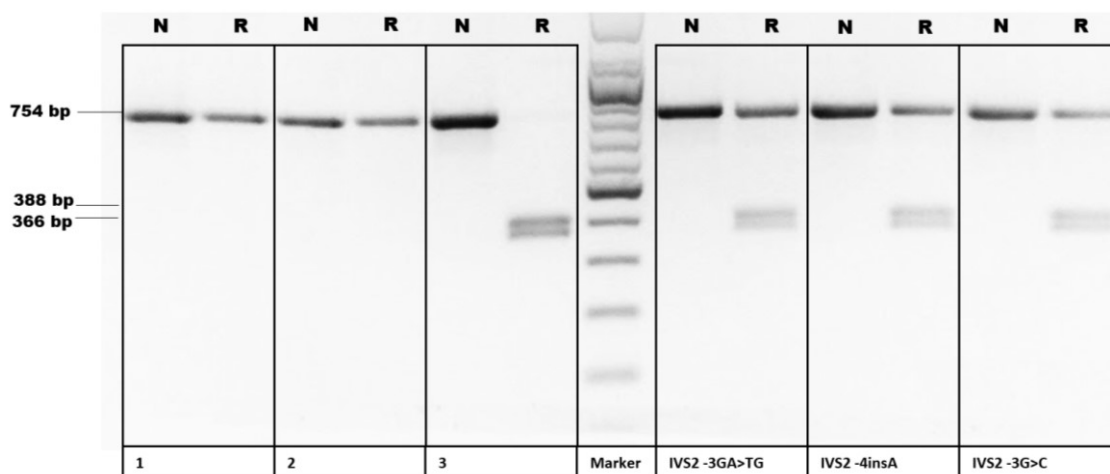
3000,“ po dobu 24 hodin dosahovala efektivita opakovaně 25 %. Tato efektivita je pro potřeby modifikace a následné selekce stabilních klonů v rámci navrženého modelového systému dostačující.

4.1.2.2. Ověření funkčnosti navrženého systému pro genomovou modifikaci

Pro ověření funkčnosti vytvořeného systému pro modifikaci genomu v buňkách U2 OS byla provedena restriční analýza směsných populací. Pojmem směsná populace byla myšlena směs U2 OS buněk, do kterých byl transfekován jeden z typů vytvořených donorových pSC A-amp/kan konstruktů se zavedenými modifikacemi před iniciačním kodómem genu *BRCA1* (3 různé směsné populace: IVS2 -3GA>TG, IVS2 -4insA, nebo IVS2 -3G>C) spolu s px330Cas9. V případě přítomnosti dostatečného množství buněk s modifikací genomu ve vyšetřované směsné populaci, by měl po PCR amplifikaci a následné restrikci *XhoI* být patrný štěpný produkt modifikované alely.

Restriční analýza je založena na přítomnosti markeru v podobě synonymní modifikace v donoru, jejíž sekvence je štěpena restriční endonukleázou *XhoI* (*XhoI* rozeznávaná sekvence 5'-C[^]TCGAG-3' ležící na c.64 až c.69 místě od iniciačního kodónu). Po PCR amplifikaci oblasti *BRCA1*, která odpovídá použitému donoru se pomocí *XhoI* PCR produkt štěpí na 2 různě dlouhé fragmenty, 366 bp a 388 bp. Restriční analýzy byla vyhodnocena pomocí gelové elektroforézy (**Obr.** 16) Jako pozitivní kontrola byl použit pro PCR amplifikaci donorový plasmid pSC se synonymní altarí v místě rozpoznávaném CRISPRem (bez modifikací v nekódujících sekvencích). Jako negativní kontrola byla pro PCR amplifikaci použita gDNA izolovaná z netransfekovaných buněk U2 OS a dále gDNA z buněk U2 OS transfekovaných samotným donorem, bez px330 Cas9 vektoru. Pro ujištění, že izolovaná DNA analyzovaná na elektroforéze pochází z genomu buněk, a ne z donorového konstruktu pSC A-amp/kan, který měl sloužit jako templátová sekvence pro homologní rekombinaci, byly provedeny dva nezávislé experimenty, které se lišily délkou kultivace buněk po ukončení transfekce 3 dny a 10 dní po ukončení transfekce. V obou případech byly buňky po ukončení transfekce opláchnuty 2x pomocí PBS a 1x pomocí kultivačního média. Kromě toho, v průběhu kultivace bylo médium měněno každý 3. den. Délka kultivace a počet výměn kultivačního média, respektive oplach buněk před izolací gDNA by měl

odstranit případné plazmidy donoru, který by mohly falešně pozitivně zkreslovat výsledek stanovení.

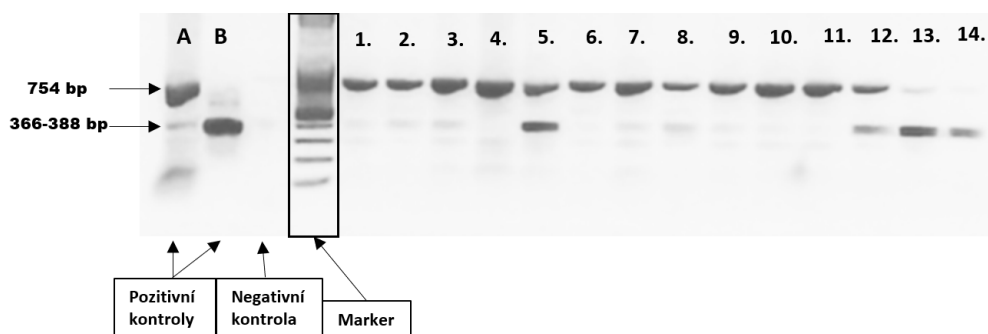


Obrázek 16: Výsledek restrikční analýzy směsných populací v agarózovém gelu. Pro ověření funkčnosti navrženého systému pro genomovou modifikaci byla provedena PCR amplifikace cílové oblasti genu *BRCA1* s následnou restrikční analýzou. Restrikční analýza využívá skutečnost, že v použitém donoru je přítomno unikátní restrikční místo pro *XhoI*. Sloupce označené „N“ jsou neštěpené PCR produkty o délce 754 bp, amplifikované z templátu gDNA izolovaného z příslušné směsné populace. Sloupce „R“ jsou PCR produkty štěpené pomocí *XhoI*. V případě přítomnosti PCR amplikonů z templátu gDNA modifikovaných buněk je výsledek restrikční analýzy charakterizován přítomností dvou fragmentů o délce 388 bp a 366 bp. **1** - Negativní kontrola restrikční analýzy: PCR s použitím templátu gDNA z netransfekovaných buněk U2 OS; **2** – Negativní kontrola transfekce/modifikace: PCR s použitím templátu gDNA ze směsné populace buněk transfekovaných pouze donorovým plazmidem pSC A-amp/kan (bez ko-transfekce px330Cas-9 plazmidem); **3** - Pozitivní kontrola restrikční analýzy: PCR s použitím donorové konstruktu pSC A-amp/kan s modifikací. Výsledky restrikční analýzy u směsných populací buněk U2 OS ko-transfekovaných donorovým plazmidem s příslušnou studovanou sekvenční alterací (*IVS2 -3GA>TG*, *IVS2 -4insA* a *IVS2 -3G>C*).

Výsledky restrikční analýzy jednoznačně ukazují, že ve směsných populacích buněk U2 OS ko-transfekovaných plazmidem px330Cas-9 a donorem pSC-A s příslušnou studovanou sekvenční alterací jsou buňky s modifikovaným genomem. Tyto buňky jsou viabilní po dobu minimálně 10 dnů od ukončení transfekce a jejich množství je dostatečné pro následnou selekci stabilních klonů. Navržený systém CRISPR a donoru je tedy v rámci použitých buněk U2 OS funkční.

4.1.2.3. Izolace stabilních klonů

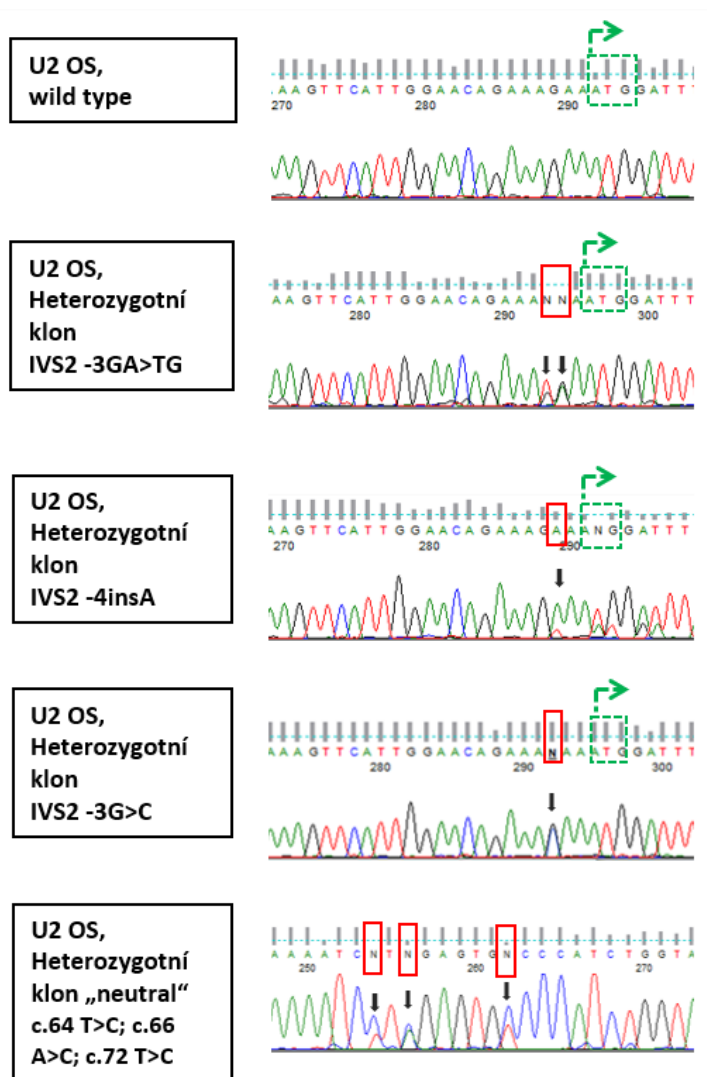
Jednotlivé klony buněk U2 OS se stabilně modifikovaným genomem byly získány po ko-transfekci a kontrole její úspěšnosti získány ze směsných populací formou „single cell“ kolonií. Po naředění (100 buněk/10 ml) směsných populací buněk U2 OS a po jejich naočkování na Petriho misky byly pod optickým mikroskopem izolovány jednotlivé „single cell colonie.“ Byly vybrány pouze kolonie dobře ohraničené a dostatečně vzdálené od jiných kolonií. Z misek, ve kterých se nacházela populace buněk U2 OS s modifikací IVS2 -3GA>TG, bylo vybráno 15 kolonií. Z misek, ve kterých se nacházely buňky U2 OS s alterací IVS2 -3G>C, bylo vybráno 14 kolonií. Stejný počet kolonií byl vybrán i z misky s buňkami U2 OS s modifikacemi IVS2 -4insA. Z misek, ve kterých se nacházely buňky U2 OS s neutrální alterací v kódující sekvenci c.64 T>C p.22Leu>Leu; c.66 A>C, bylo vybráno 11 kolonií. Buňky byly nejprve namnoženy do většího množství postupnou kultivací v 96, 24 a 12-ti jamkových destičkách. Při následné pasáži byla část buněk použita pro izolaci gDNA a analýzu restrikcí *XhoI* (**Obr.** 17). Jako pozitivní kontrola sloužil donorový konstrukt pSC A-amp/kan se zavedenými modifikacemi a jako negativní kontrola sloužila ddH₂O.



Obrázek 17: Restrikční analýza izolovaných „single cell“ kolonií IVS2 -3G>C. Vzorky DNA kolonií buněk 1-14 byly ošetřeny *XhoI* a analyzovány elektroforetickou separací. Pozitivní kontrolou byl donorový modifikovaný konstrukt pSC A-amp/kan. A jsou vzorky DNA bez *XhoI*, B jsou vzorky DNA ošetřené *XhoI*. Negativní kontrolou byla ddH₂O. Pro další analýzu byly vybrány klony kolonií číslo 5, 12, 13 a 14. V koloniích číslo 5 a 12 se nacházejí dva fragmenty (754 bp a 366-388 bp), což poukazuje na přítomnost obou alel (wt i mutované), což napovídá, že jsou klony těchto buněk pro modifikace heterozygotní. Kolonie číslo 13 a 14 se jeví jako klony buněk pro modifikovanou alelu homozygotní, neboť jsou na elektroforéze vidět pouze kratší fragmenty.

Pro potvrzení přítomnosti modifikací v genomu byly kolonie vybrané pomocí restriční analýzy podrobeny analýze Sangerovým sekvenováním (**Obr. 18**). Sekvenováním a následným zobrazením chromatogramu v programu Finch TV (Geospiza Inc.; Seattle) bylo zjištěno, že byly vytvořeny pouze heterozygotní klony pro vybrané modifikace.

Chromatogram vygenerovaný Sangerovým sekvenováním ilustroval, že byl vyroben 1 heterozygotní klon s modifikací v alele IVS2 -3GA>TG, 1 heterozygotní klon s modifikací v alele IVS2 -3G>C, 2 heterozygotní klony s modifikací v alele IVS2 -4insA a 2 heterozygotní klony s modifikací c.64 T>C p.22Leu>Leu; c.66 A>C.



Obrázek 18: Výsledky Sangerova sekvenování klonů pro potvrzení přítomnosti stabilně zavedených modifikací v gDNA U2 OS buněk. Zeleným přerušovaným rámečkem je označen iniciační kodón genu BRCA1. Červeným rámečkem jsou zobrazeny modifikované báze a černými šipkami jsou naznačené píky modifikovaných nukleotidů.

Průměrná úspěšnost modifikace genomu vytvořeným systémem (**Tabulka č. 1**) byla 5,7 %. V případě použití donorů se sekvenční alterací ve vyšetřované oblasti promotoru byla úspěšnost genomové modifikace výrazně nižší (v průměru 4,6 %), než v případě použití donoru obsahujícího pouze synonymní sekvenční alterace v kódující části – BRCA1 exon 2 (9,1 %).

Tabulka 1: Efektivita zavádění modifikací. Úspěšnost zavádění modifikací do genomu buněk U2 OS vytvořeným systémem. Ačkoliv se úspěšnost zavedení pouze do 5,7 % alel nezdá jako vysoké číslo, pro vytvoření modelového systému, který bude sloužit pro funkční charakteristiku vybraných modifikací, je dostačující.

Modifikace	Celkový počet alel	Počet modifikovaných alel	Úspěšnost modifikace (%)
IVS2-3G>C	28	1	3,3
IVS2-4insA	28	2	7,1
IVS2-3GA>TG	30	1	3,6
Neutrální alterace	22	2	9,1
Celkem	86	4	5,7

Úspěšně se podařilo optimalizovat modelový systém pro určení funkční *in vitro* charakterizaci sekvenčních alterací v regulačních nekódujících oblastech a ustanovit heterozygotní klony se stabilně modifikovaným genomem (IVS2 -3GA>TG, IVS2 -3G>C, IVS2 -4insA) genu *BRCA1*.

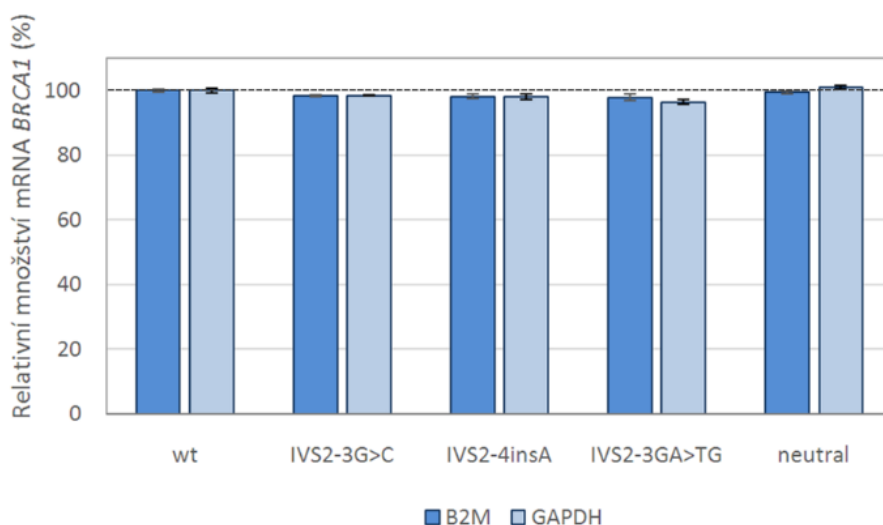
4.2. Funkční charakterizace izolovaných variant

4.2.1. Stanovení množství mRNA

Množství mRNA v buňkách U2 OS s různými modifikacemi v genu *BRCA1* bylo stanoveno pomocí RT-qPCR, kdy jako templát posloužila cDNA připravená z mRNA jednotlivých klonů buněk U2 OS s modifikacemi.

Expres BRCA1 mRNA byla stanovena jako 100 % v netransfekovaných buňkách U2 OS. Hodnoty (**Obr. 19**) exprese *BRCA1* na úrovni mRNA se v buňkách U2 OS modelového systému se téměř nelišily od buněk U2 OS typu wt. Tento výsledek

potvrzuje, že žádná ze zavedených alterací zavedených v buňkách U2 OS nezasahuje do regulace exprese *BRCA1* na úrovni transkripce.



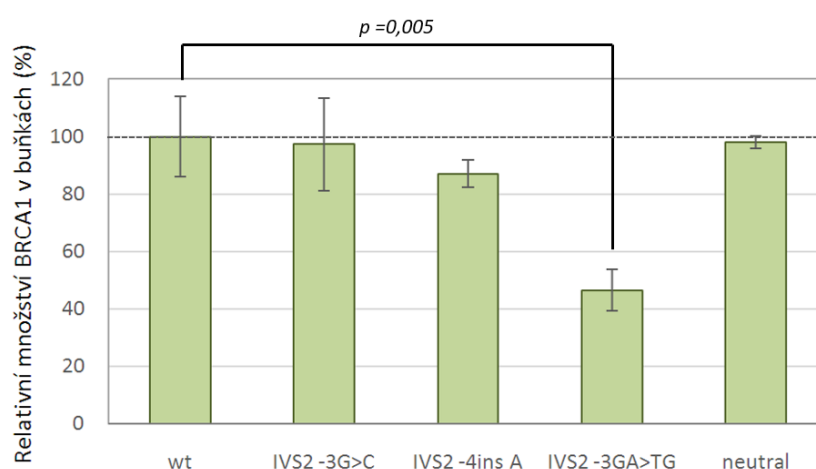
Obrázek 19: Relativní exprese *BRCA1* na úrovni mRNA v buňkách U2 OS modelového systému. Expresse byla vyhodnocena v jednotlivých klonech pomocí RT-qPCR s využitím dvou referenčních genů – β -2- mikroglobulin (**B2M**) a glyceraldehyd 3-fosfát-dehydrogenázy (**GAPDH**). V netransfekovaných buňkách U2 OS byla exprese stanovena jako 100 % a míra exprese v ostatních buňkách k ní byly vztahy. Výsledky zobrazují průměr ze dvou biologických replikátů analyzovaných v tripletech \pm směrodatná odchylka.

Pomocí RT-qPCR se podařilo stanovit míru exprese genu *BRCA1* na úrovni mRNA ve všech vyšetřovaných klonech reprezentujících jednotlivé studované sekvenční alterace. Míra exprese na úrovni mRNA se v žádném z analyzovaných vzorků statisticky významně nelišila od exprese v kontrolních netransfekovaných U2 OS buňkách.

4.2.2. Stanovení množství proteinu *BRCA1*

Množství proteinu, které produkují jednotlivé klony U2 OS buněk s různými modifikacemi, bylo stanoveno pomocí ELISA. Vzhledem k tomu, že *BRCA1* patří mezi velmi málo exprimované geny je pro kvantifikaci na úrovni proteinu nejvhodnější ELISA, která je velmi citlivá a umožňuje porovnávat vzorky s velmi malým množstvím proteinu. Pro relativní kvantifikaci bylo množství *BRCA1* proteinu v kontrolních netransfekovaných buňkách U2 OS stanoveno jako 100 %. Všechny ostatní výsledky byly k této hodnotě vztahovány.

Bylo zjištěno, že neutrální sekvenční alterace (označované jako „neutral“) v kódující oblasti BRCA1 exonu 2, nemají statisticky významný vliv na míru exprese BRCA1 proteinu v buňkách U2 OS. Exprese BRCA1 proteinu u všech vyšetřovaných sekvenčních alterací v promotorové oblasti byla nižší. V případě heterozygotního klonu **IVS2 -3GA>TG** dosahovala míra exprese BRCA1 proteinu úrovně $46,5 \pm 7,5$ % úrovně kontrolních buněk. Buňky s monoalelickou modifikací **IVS2 -4insA** produkovaly oproti kontrolním buňkám $87 \pm 4,9$ % BRCA1 proteinu. Téměř shodné množství proteinu jako buňky wt produkovaly buňky s alterovanou alelou v genu *BRCA1* **IVS2 -3G>C** $97,4 \pm 16,2$ % (**Obr. 20**).



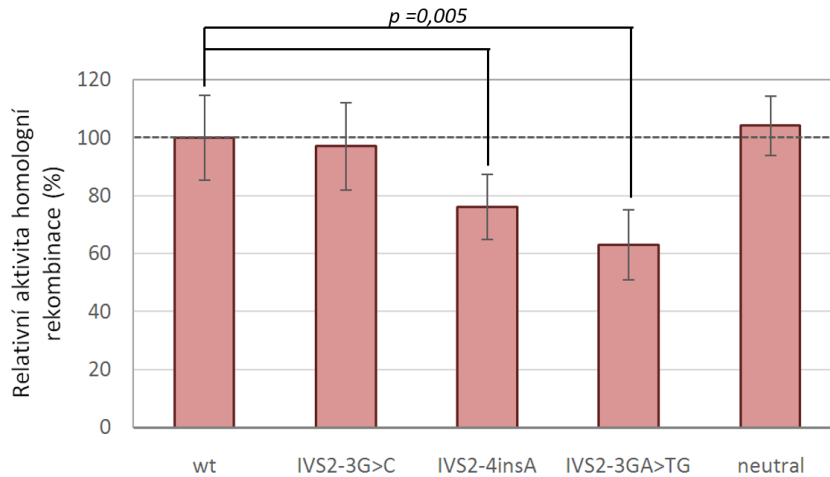
Obrázek 20: Relativní množství proteinu BRCA1 produkovaného buňkami U2 OS s vyšetřovanými sekvenčními alteracemi v nekódující části genu BRCA1. Množství proteinu, které buňky U2 OS produkovaly, bylo stanoveno pomocí metody ELISA. Relativní množství bylo vztaženo na hodnotu exprese u kontrolních netransfekovaných buněk U2 OS (wt) – ta byla určena jako 100 %. Data představují průměr ze dvou biologických replikátů analyzovaných v tripletech, \pm směrodatná odchylka. K hodnocení statistické významnosti byl použit neparametrický T-test na hladině významnosti * $p = 0,005$.

Pomocí metody ELISA bylo zjištěno, že neutrální sekvenční alterace v kódující části BRCA1 exonu 2 nemají na expresi BRCA1 proteinu statisticky významný vliv. Sekvenční alterace IVS2 -3GA>TG a IVS2 -4insA oproti tomu expresi BRCA1 na úrovni proteinu statisticky významně snižovaly a to i v případě heterozygotních klonů buněk modelového systému.

4.2.3. Stanovení aktivity homologní rekombinace

Mezi všeobecně uznávanou hlavní funkci proteinu BRCA1 je jeho přímá účast na procesu opravy dvouřetězcových zlomů DNA pomocí homologní rekombinace. Pro zjištění vlivu analyzovaných sekvenčních alterací na aktivitu této reparační dráhy bylo provedeno přímé stanovení aktivity HR pomocí DR-GFP reporterového systému stabilně inkorporovaného do genomu buněk U2 OS. K vyhodnocení eseje byla použita průtoková cytometrie.

Pro posouzení vlivu jednotlivých sekvenčních alterací byla aktivity HR v analyzovaných klonech vztažena k aktivitě HR v kontrolních netransfekovaných buňkách U2 OS (100 %). Bylo zjištěno, že neutrální sekvenční alterace v kódující oblasti BRCA1 exonu 2 nemají statisticky významný vliv na aktivitu HR v buňkách U2 OS. (**Obr. 21**). Aktivita HR byla u všech vyšetřovaných sekvenčních alterací v promotorové oblasti nižší, v porovnání s kontrolami. Nejnižší hodnotu aktivity měly buňky s modifikací **IVS2 -3GA>TG** v jedné alele, jejichž hodnota byla vzhledem k wt pouze 63 ± 12 %. Ke snížení aktivity HR došlo také v buňkách s modifikací **IVS2 -4insA** v alele genu BRCA1 a to na $76 \pm 11,2$ %. Oproti tomu aktivita homologní rekombinace téměř nepoklesla u buněk s modifikací **IVS2 -3G>C**, jejichž aktivita vzhledem k wt byla 97 ± 15 %.



Obrázek 21: Relativní aktivita homologní rekombinace v buňkách U2 OS s různými variantami genu BRCA1. Aktivita homologní rekombinace byla stanovena pomocí DR-GFP reporterového systému stabilně inkorporovaného do genomu buněk U2 OS a analyzována pomocí průtokové cytometrie. Hodnoty aktivity HR v jednotlivých vyšetřovaných kloněch byly vztaženy k hodnotě HR v kontrolních netransfekovaných buňkách U2 OS (WT). Data představují průměr ze dvou biologických replikátů analyzovaných v tripletech \pm směrodatná odchylka. K hodnocení statistické významnosti byl použit neparametrický T-test na hladině významnosti * $p = 0,005$.

Pomocí modelového systému bylo zjištěno, že vyšetřované sekvenční alterace v promotorové oblasti genu BRCA1 statisticky významně ovlivňují biologickou aktivitu expresního produktu BRCA1. Snížení aktivity HR u analyzovaných klonů pozitivně koreluje s mírou exprese BRCA1 proteinu v buňkách. Výsledky ukazují, že sekvenční alterace IVS2 -3GA>TG téměř ruší expresi genu BRCA1 na úrovni proteinu s významným dopadem na aktivitu HR. To naznačuje, že tato sekvenční alterace je pravděpodobně patogenní a u nosičů může mít významný vliv na riziko vzniku karcinomu prsu.

5. Diskuze

BRCA1 je tumor supresorový gen produkující protein BRCA1, který se podílí na udržování genomové integrity, což zajišťuje zejména svou přímou účastí na opravě dvouřetězcových zlomů mechanismem homologní rekombinace. Inaktivace BRCA1 je prokazatelně spojena s vysokým celoživotním rizikem vzniku četných malignit – především karcinomu prsu, ovarií, pankreatu aj. V České populaci je až 25 % všech případů hereditárního karcinomu prsu způsobeno mutací v tumor supresorových genech *BRCA1*, nebo *BRCA2* (Pohlreich *et al.* 2003). I přes současný pokročilý stav poznání onkogenetiky karcinomu prsu je možné vysvětlit příčiny vzniku pouze u necelé poloviny všech familiárních karcinomů prsu. Pochopitelnou snahou je tedy identifikace faktorů zodpovědných za vznik všech případů hereditární formy tohoto nádorového onemocnění. Díky plošnému využití NGS metod pro potřeby genetického skrínungu je identifikováno značné množství sekvenčních alterací v predispozičních genech. Pro klinickou aplikaci těchto výsledků je však nutné jednotlivé detekované sekvenční alterace klinicky klasifikovat. Při tomto procesu jsou identifikované sekvenční varianty zařazeny do jedné ze skupin: (1) prokazatelně patogenní, (2) spíše patogenní, (3) varianty nejasného významu, VUS (variants of unknown significance), (4) spíše benigní, (5) prokazatelně benigní. Vzhledem k množství identifikovaných variant a náročnosti klinické klasifikace je však stále více než polovina známých sekvenčních alterací v genu *BRCA1* klasifikována jako „class“ 3 – varianta s nejasným klinickým významem (Plon *et al.* 2008). Další otázkou v problematice onkogenetiky karcinomu prsu je výskyt nádorů typických pro nosiče mutací v *BRCA1* – triple-negativní basal-like karcinom, u kterých nebyla nalezena žádná patologická mutace ve známých predispozičních genech. Vzhledem k tomu, že naprostá většina metod genetického skrínungu se logicky zaměřuje pouze na kódující oblast genu, existuje možnost, že inaktivace genu *BRCA1* je způsobena mutací v nekódujících, ale přitom funkčně významných oblastech – promotor, 3' UTR aj., které jsou důležité pro regulaci exprese a mohou významně alterovat biologickou funkci produktu genové exprese. Důkaz o vlivu nekódujících variant na riziko vzniku karcinomu prsu chybí a to především z důvodu chybějícího modelového systému pro funkční charakterizaci a následnou klinickou klasifikaci. Na rozdíl od metod používaných k posouzení vlivu sekvenčních alterací v kódující oblasti na biologickou aktivitu proteinu, se systém pro funkční charakterizaci nekódujících variant zaměřuje na stanovení míry komplexního procesu genové exprese. V případě genu *BRCA1* navíc nebyl dosud plně

popsán vztah mezi mírou exprese a vlivem na procesy, ve kterých protein BRCA1 figuruje.

Prvním cílem práce bylo vytvořit a optimalizovat modelový systém pro funkční charakterizaci sekvenčních variant v nekódujících oblastech genu BRCA1. Byl navržen postup modifikace genomu buněk U2 OS, který dovoluje přímo stanovit aktivitu homologní rekombinace, pomocí CRISPRem-zprostředkovanému knock-inu.

Pomocí restriční analýzy směsných populací (4.1.2.2) bylo zjištěno, že k žádoucí modifikaci dochází u relativně velkého počtu buněk transfekovaných vytvořeným px330cas a donorem. Z těchto výsledků však nelze přímo stanovit úspěšnost zavedení modifikací, neboť PCR, následné štěpení restričním enzymem a kontrola elektroforézou není kvantitativní metoda. Skutečná účinnost systému zavádění modifikací byla pouze 5,7 %. Vysvětlením zdánlivého rozporu výsledků restriční analýzy a skutečné efektivity modifikace je možnost, že jde o pozůstatek z donorových konstruktů pSC A-amp/kan, což je však vysoce nepravděpodobné, protože byly vytvořeny dvě nezávislé kontroly. Navíc byly buňky po skončení ko-transfekce oplachovány pomocí PBS a kultivačního média. První kontrola byla kultivována 3 dny a druhá kontrola 10 dní. Kultivační médium bylo vyměňováno každé 3 dny. Po analýze na elektroforetickém gelu byla vizualizace kontrolních vzorků po 3 dnech i vizualizace kontrolních vzorků po 10-ti dnech identické jako vizualizace původního vzorku, proto je přítomnost konstruktů v buňkách téměř vyloučena, neboť byly nejspíše procesem vypláchnuty.

Původním záměrem práce bylo vytvořit modelový systém pro funkční charakterizaci variant s homozygotními klony pro vybrané modifikace, ale vytvoření systému s oběma modifikovanými alelami se bohužel nepodařilo. To, že se podařilo selektovat jen heterozygotní klony, mohlo být vyvoláno hned několika faktory.

Za prvé mohla neúspěch zavedení modifikací do obou dvou alel způsobit nízká efektivita modifikace „knock in,“ která byla 5,7 %. V literatuře často diskutovaným problémem obecně nízké efektivity CRISPRem zprostředkované genomové modifikace je fakt, že preferovaným mechanismem oprav dvouřetězcových zlomů DNA v eukaryontních buňkách je NHEJ, který nevyužívá donorovou sekvenci se studovanou sekvenční alterací (Mao *et al.* 2008; Jinek *et al.* 2012). Pro úspěšné zavedení modifikací

do buněk je ale nutné opravit zlomy pomocí HR, které využije vlákno v donorovém konstrukt. Jednou z možností by tedy mohla být specifická inhibice NHEJ dráhy pomocí inhibitorů proteinů podporujících NHEJ. V literatuře jsou popsány výsledky ukazující, že použití inhibitoru DNA ligázy IV, Scr7, může zvýšit efektivitu genomové modifikace (Chu *et al.* 2015; Maruyama *et al.* 2015). Alternativou je naopak stimulace HR. V této souvislosti byl popsán pokus s použitím látky RS-1, která stimuluje aktivitu RAD51 (Pinder *et al.* 2015). **Druhou** možností, kterou lze vysvětlit, že byly vytvořeny pouze heterozygotní klony, je fakt, že BRCA1 je důležitý pro opravy dvouřetězcových zlomů DNA pomocí HR. Naše výsledky ukazují, že alterace jedné alely je schopná výrazně snížit expresi BRCA1 a tím i aktivitu HR. Homologní rekombinace je však pro vytvoření modelového systému navrženým postupem s těžejní, neboť pomocí tohoto opravného mechanismu je zaváděna modifikace do gDNA. Pokud je funkce proteinu BRCA1 po modifikaci jedné alely porušena, mohla by být negativně ovlivněna aktivita HR a tím pádem by se snížila šance následné opravy dvouřetězcových zlomů indukovaných CRISPR-Cas9 pomocí HR.

Třetí možností, která mohla tento výsledek způsobit, je letalita homozygotních buněk v případě modifikací, které gen *BRCA1* vyřadí z funkce. Bylo popsáno, že úplná ztráta funkce genu *Brcal* je pro myši embryonální buňky letální a myši embryo *Brcal*^{-/-} se přestane vyvíjet v brzké embryogenezi (Gowen *et al.* 1996; Hakem *et al.* 1996). Tuto letalitu lze u embryonálních buněk částečně zachránit vyřazením genu p53, či p21 z funkce (Hakem *et al.* 1997), ale takové buňky se projevují genomovou nestabilitou (Fukasawa *et al.* 1997). Lze tedy usuzovat, že ztráta *Brcal* aktivuje dráhu p53, která vede buňku k apoptóze (Clarke *et al.* 1993). Pokud by tedy jakákoliv z analyzovaných sekvenčních alterací způsobila kritické snížení exprese genu *BRCA1*, došlo by v případě úspěšné modifikace obou alel k apoptóze u takto vytvořeného homozygotního klonu. Tyto studie byly ale prováděny na myších embryonálních buňkách a myší protein *Brcal* má 55 % sekvenční identitu s lidským proteinem BRCA1 (Abkevich *et al.* 2004), zůstává proto otázkou, zda se tak děje také v lidských embryonálních buňkách a jaká je skutečná letalita buněk v případě deficiencie *BRCA1*. V případě správnosti této hypotézy by bylo možné vyhnout se letálnímu účinku inaktivace genu BRCA1 předchozím knock-outem P53. Vzhledem k úloze P53 v udržování genomové integrity by to však znamenalo výrazný zásah do modelového systému a výsledky by bylo nutné interpretovat v rámci tohoto nefyziologického prostředí.

Ač šlo o vytvoření jiných podmínek v modelovém systému, než které byly původně zamýšleny, neznamenalo to pro tuto práci problém, protože tak mohla být simulována situace v buňkách pacientů s hereditární formou karcinomu prsu, kteří obvykle nesou mutaci v jedné z alel genu *BRCA1*.

Zajímavým zjištěním byl rozpor ve výsledku restriční analýzy jednotlivých selektovaných „single cell colonies“ klonů (4.1.2.3). U buněk U2 OS ko-transfekovaných px330Cas9 a donorem s alterací **IVS2 -3G>C** se klony 13 a 14 jeví jako homozygotní (**Obr. 17**). Sangerovo sekvenování však v obou případech odhalilo přítomnost pouze wt alely. Jednou možností vysvětlující tento rozpor je výše diskutovaná letalita homozygotních mutantů dané sekvenační varianty. V tom případě by z buněčné populace homozygotní klony po určité kultivační době spontánně vymizely v důsledku indukce apoptózy. Vzhledem k tomu, že klony byly získány ze „single cell“ kolonií izolovaných manuálně pod optickým mikroskopem, je nemožné, že by se jednalo o populaci wt a homozygotních buněk, ze které by selekcí zbyly pouze wt buňky. Kromě toho, varianta **IVS2 -3G>C** podle našich výsledků ovlivňuje expresi *BRCA1* a aktivitu HR statisticky nevýznamně v porovnání s kontrolami. Tato varianta je tudíž pravděpodobně benigní a neměla by tak indukovat apoptózu výše popsaným mechanismem. Dalším možným vysvětlením je průběh samotné HR s využitím donoru pSC-A. Studovaná varianta **IVS2 -3G>C** je od místa PAM štěpeného použitým CRISPRem vzdálena 78 bp. V průběhu HR vznikají resekce jednořetězcové přesahy v délce stovek nukleotidů, které následně invadují do homologní oblasti sesterské chromatidy a jsou následně doplněny polymerační aktivitou DNA polymerázy. Pro použití donorového plazmidu pro potřebu genomové modifikace je v literatuře doporučena délka homologních ramen 450 bp. Z našich výsledků však vyplývá, že pro opravu CRISPRem indukovaného dvouřetězcového zlomu bylo využito méně než 78 nukleotidů homologní části donoru. Tento rozpor našich výsledků s obecně popisovaným mechanismem HR byl dokázán sekvenováním klonů v oblasti PAM a v oblasti zamýšlené modifikace. Klony U2 OS **IVS2 -3G>C** 13 a 14 byly skutečně homozygotní pro synonymní alterace v místě rozeznávaném CRISPRem, ale wt v promotorové oblasti. Tento jev by potenciálně bylo možné omezit použitím krátkých jednořetězcových oligonukleotidů jako donorů pro CRISPRem – zprostředkovanou modifikaci mechanismem HR.

Modelový systém založený na cílené modifikaci genomu buněk se ukázal být schopný funkčně charakterizovat dopad sekvenčních alterací na genovou expresi a aktivitu klíčové dráhy, na které se BRCA1 podílí. Na rozdíl od současně používaných reportérových systémů má tento model výhodu v komplexním posouzení vlivu varianty na expresi v rámci normálně fungující buňky. Kromě toho, v případě úspěšného zavedení studované varianty do modelových buněk, není následná analýza vysoce senzitivní na techniku a prostředí provedení funkčních studií. Na druhou stranu efektivita genomové modifikace je velmi nízká, v případě patogenních variant není v rámci modelového systému možné selektovat homozygotní klony a celý proces je časově velmi náročný, což značně omezuje počet vyšetřovaných variant.

Další část diskuze se bude zabývat funkční charakteristikou genových variant v nekódujících sekvencích, která byla prováděna v buňkách modelového systému a samotnými modifikacemi.

V modelovém systému bylo nejdříve analyzováno množství mRNA *BRCA1*. Tato analýza byla nutná pro zjištění, na jaké úrovni dochází k ovlivnění regulaci exprese genu studovanými variantami. Pokud by se množství mRNA *BRCA1* mezi buňkami s jednotlivými modifikacemi v genomové DNA lišilo, dalo by se usuzovat, že modifikace zasáhly nějakým způsobem do *cis* regulačních oblastí transkripce, nebo ovlivnily stabilitu mRNA například skrze porušení vazebného místa pro RNA vazebné proteiny, které mohou být sekvenčně specifické a mohou ovlivnit stabilitu mRNA (Hasan *et al.* 2014). Tyto možnosti byly ale vyloučeny, protože množství mRNA *BRCA1* se ve všech typech buněk shodovalo. Tento výsledek byl předpokládáný, neboť modifikace byly zavedeny těsně před iniciačním kodónem translace do konsensního místa Kozakové sekvence (5'-GAAAGAAATGG-3'), což znamená, že tyto modifikace by měly v první řadě ovlivňovat aktivitu translace a na transkripční aktivitu by neměly mít vliv. Tento výsledek tedy indikoval, že pokud se množství proteinů v buňkách liší, bude to způsobeno regulací na úrovni aktivity translace a bude se tedy měnit množství proteinu.

Dalším krokem bylo zjištění množství BRCA1 v buňkách. Pro detekci množství proteinu BRCA1 byla užita metoda ELISA, která je pro stanovení množství proteinu BRCA1 vhodnější než metoda Western blot. Western blot je semikvantitativní metoda. V případě málo exprimovaných genů je síla signálu pozadí tak vysoká, že téměř znemožňuje stanovit menší rozdíly v koncentraci daného proteinu. *BRCA1* je velmi málo

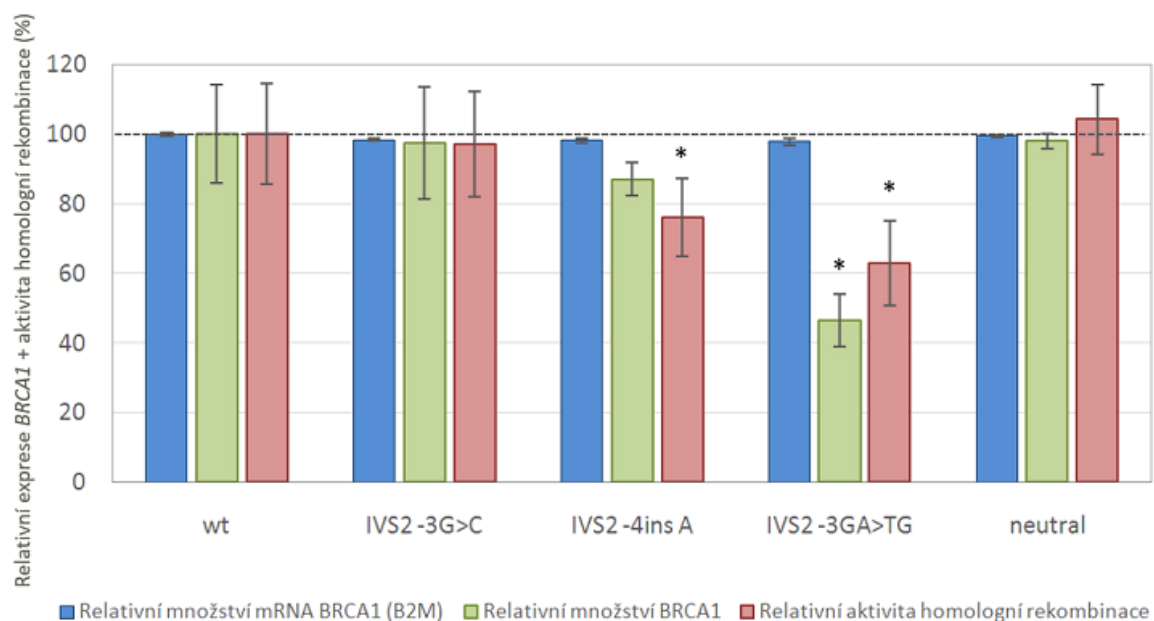
exprimovaný gen. Počet kopií mRNA *BRCA1* v buňce se pohybuje v řádech desítek. Proto je pro tento pokus, jehož hlavním úkolem bylo porovnat rozdíl mezi počtem kopií *BRCA1* v buňkách typu wt s množstvím kopií *BRCA1* v buňkách s modifikacemi, vhodnější volbou ELISA, která umožňuje přesnější a citlivější kvantifikaci.

Bylo zjištěno že *IVS2 -3GA>TG* a *IVS2-4insA* statisticky významně snižují expresi *BRCA1* na úrovni proteinu. Toto snížení exprese bylo vzhledem k lokalizaci těchto sekvenčních variant v oblasti sekvence Kozakové předpokládáno. V místě -3 od iniciačního ATG jsou ribozomem preferovány purinové báze (Adenin, nebo guanin) (Kozak 1987). Transverzní mutace v genu pro alfa-globin na místě -3 před startujícím kodónem ATG byla dokonce popsána jako mutace, která vyvolává formu alfa + thalassemie (Morle *et al.* 1986), což podporuje hypotézu, že varianty v těchto místech mohou způsobovat patologické projevy.

Vliv sekvenčních alterací na expresi *BRCA1* byl v některých případech předpovězen pomocí *in silico* analýzy. V buňkách s modifikací *IVS2 -3GA>TG* bylo v tomto experimentu množství *BRCA1* sníženo na $46,5 \pm 7,5$ % oproti buňkám wt (**Obr. 22**). Množství proteinu s touto modifikací bylo před experimentem předpovězeno pomocí *in silico* analýzy (Noderer *et al.* 2014). *In silico* analýza předpověděla snížení množství *BRCA1* v alele s touto modifikací, na 50 %. Produkce *BRCA1* v heterozygotních buňkách s jednou wt alelou a s jednou modifikovanou alelou, by tedy měla být 75 %. Hodnota stanovená v tomto experimentu však byla nižší. Dle výsledků lze dokonce usuzovat, že způsobená modifikace téměř, nebo dokonce zcela, vyřadila takto modifikovanou alelu z funkce. Oproti tomu snížení množství kopií *BRCA1* v alele s modifikací *IVS2 -3G>C* bylo *in silico* studií (Noderer *et al.* 2014) odhadnuto na 80 %. V případě jedné monoalelické modifikace je tedy množství kopií *BRCA1* odhadnuto na 90 %. Translace této varianty genu *BRCA1* byla v jiné studii analyzována na chimérickém genu *BRCA1*, který produkoval protein luciferázu. Expese této varianty byla *in vitro* snížena o 30–50 % a *in vivo* na buňkách HEK293, do kterých byl chimérický gen tranzientně transfekován, až o 70 % (Signori *et al.* 2001). Detekované množství *BRCA1* v tomto experimentu v buňce s variantou *IVS2 -3G>C* bylo proti buňkám wt nevýznamné ($97,4 \pm 16,2$ %). To se neshoduje s výsledky výše zmíněných studií. Tento rozpor mohla zapříčinit spousta faktorů, například použití jiného typu buněk, či vliv dalších regulačních elementů, které ve zmíněných studiích s chimérickým genem nejsou

přítomny. Varianta **IVS2 -4insA** zatím nebyla analyzována v žádných studiích. Byla však detekována u pacientů s familiárním karcinomem prsu, u kterých nebyla nalezena alterace v kódujícím regionu genů *BRCA1* a je zařazena do skupiny variant nejasného významu. Oproti wt bylo množství proteinu v buňkách s touto variantou $87 \pm 4,9 \%$, což znamená, že tato varianta snižuje aktivity translace o jednu třetinu. Závěr z detekce množství proteinu BRCA1 všech modifikovaných buněk pomocí ELISA potvrzuje závěry již zmíněných studií (Signori *et al.* 2001; Noderer *et al.* 2014), které říkají, že alterace v nekódujících 5' UTR sekvencích genu *BRCA1* mohou mít vliv na expresi proteinu BRCA1.

Předpokládá se, že mutace v genu *BRCA1* vedou k maligní transformaci kvůli nedostatečné aktivitě HR a tím i k neschopnosti buněk udržet genomovou integritu (Moynahan *et al.* 1999). Proto bylo dalším úkolem zjistit aktivitu HR v modelovém systému, který nesl alterace. Studie týkající se aktivity homologní rekombinace buněk s variantami v 5' UTR oblasti genu *BRCA1* zatím neexistují. Naproti tomu byla již stanovována aktivita homologní rekombinace v buňkách s mutacemi ležícími v kódující oblasti *BRCA1* (Bouwman *et al.* 2013; Towler *et al.* 2013; Anantha *et al.* 2017). Výsledky z této práce poukázaly především na sníženou aktivitu homologní rekombinace u buněk s monoalelickou alterací **IVS2 -3GA>TG** a o něco nižší byla i aktivita homologní rekombinace v buňkách s monoalelickou modifikací **IVS2 -4insA**. V literatuře zatím nebyl popsán přímý vztah mezi množstvím proteinu BRCA1 v buňce a aktivitou homologní rekombinace. Existují studie, kde bylo cíleně sníženo množství BRCA1 a v rámci nich byla stanovována aktivita HR, ale účelem studií nebylo porovnání těchto dvou jevů (Garcia *et al.* 2011). Dle výsledku z buněk s alterací **IVS2 -3GA>TG** lze usuzovat, že významně snížené množství kopií BRCA1 v buňce sníží také aktivitu HR v buňce. Naše výsledky tedy ukazují na pozitivní korelaci mezi množstvím proteinu BRCA1 – tedy mírou jeho exprese a aktivitou HR (**Obr. 22**).



Obrázek 22: Souvislost mezi mírou exprese genu *BRCA1* na úrovni mRNA a proteinu a aktivitou homologní rekombinace. Hodnoty modifikovaných buněk byly vztaženy k hodnotám buněk wt (100 %). Výsledky představují průměr ze dvou biologických replikátů, měřených v tripletech ± směrodatná odchylka. Výsledky označené * jsou statisticky významně odlišné od kontrolních vzorků netransfekovaných buněk WT na $p = 0,005$.

Tato práce není jediná, která se zabývá nekódujícími regiony genu *BRCA1*. Existují již dříve zmíněné studie týkající se IVS2 -3GA>TG (Signori *et al.* 2001) a existuje i studie týkající varianty na místě -2 od iniciačního ATG, která byla analyzována na úrovni translace. Tato studie také potvrdila, že je počet kopií *BRCA1* v této variantě nižší oproti wt sekvenci (Wang, Lu, *et al.* 2007). Další studie odhalila, že ve variantě *BRCA1*, ve které je narušena Kozakové sekvence na místě -1 a +3 s ohledem na iniciační kodón, je využit alternativní iniciační kodón nacházející se „downstream“ od originálního iniciačního kodónu a tato varianta produkuje *BRCA1* o 17 původních aminokyselin kratší než wt (Liu *et al.* 2000). Jiná studie se týkala varianty nalezené v exonu 1a, která byla spojena s hypermethylací CpG v oblasti promotoru (Evans *et al.* 2018). Mimo to existují také studie, které analyzují varianty v 3' UTR oblasti (Pongsavee *et al.* 2009; Pelletier *et al.* 2011; Dorairaj *et al.* 2014). Všechny souhlasí s výsledky této práce a společně potvrzují, že nekódující sekvence genu *BRCA1* mohou ovlivnit jeho množství, biologickou aktivitu produktu genové exprese a mohou tak významně ovlivnit riziko vzniku karcinomu prsu.

Ze studií ale pořád ještě není jasné, o kolik musí být množství BRCA1 sníženo, aby k maligní transformaci buňky došlo. Balderyon *et al.* porovnával množství wt BRCA1 v buňkách pacientů trpících hereditární formou karcinomu prsu s buňkami zdravých jedinců a zjistil, že buňky pacientů s monoalelickou mutací mají oproti buňkám zdravých jedinců mnohem nižší expresi wt BRCA1 (Baldeyron *et al.* 2002). Je však nutné zmínit, že *BRCA1* je tumor supresor, což obvykle znamená, že pro maligní transformaci potřebuje buňka ztratit obě alely genu, tzv. „two hit theory,“ v případě pacientů s jednou nepříznivou mutantní alelou *BRCA1* by tedy muselo dojít ke ztrátě heterozygosity (Knudson 1971). Takový závěr však není pro *BRCA1* zcela správný, neboť se objevuje stále více studií, které se kloní k tomu, že je *BRCA1* haploinsuficientní a již nepříznivá mutace jedné alely má za následek zvýšenou nestabilitu genomu, což by mohlo způsobit, že buňky nosičů těchto mutací mají vyšší šanci k tomu přijít i o druhou alelu, či k dalšímu poškození genomu (Konishi *et al.* 2011; Sedic *et al.* 2015). Dalším potvrzením tohoto názoru je studie tvrdící, že ztrátě heterozygosity *BRCA1* u nosičů předchází mutace v jiných genech, např. *PTEN* a *TP53*, a že v některých buňkách karcinomu prsu je alespoň jedna wt alela přítomna, čili existuje pravděpodobnost, že k maligní transformaci buňky není ztráta heterozygosity potřeba (Martins *et al.* 2012). Studií, které podporují tuto teorii je víc (Burga *et al.* 2009; Proia *et al.* 2011; Savage *et al.* 2014).

Nekódující regulační oblasti tak z tohoto hlediska představují oblast, která by při genetickém vyšetření neměla být opomíjena a klinická klasifikace nekódujících variant je kriticky důležitá.

6. Závěr

- Byl připraven modelový systém pro funkční charakteristiku vybraných sekvenčních variant v nekódující oblasti genu *BRCA1* (IVS2 -3GA>TG, IVS2 -3G>C, IVS2 -4insA). Všechny buňky byly pro zavedené alterace heterozygotní.
- Množství proteinu i aktivita homologní rekombinace poklesla oproti buňkám wt zejména v modelovém systému buněk s alterací IVS2 -3GA>TG.
 - Množství proteinů bylo, vzhledem k wt buňkám, u této varianty snížena na 46,5 % ($\pm 7,5$ %) a aktivita HR byla, vzhledem k wt buňkám, snížena až na 63 % (± 12 %). Tento výsledek potvrdil, že alterace v nekódující regulační sekvenci genu *BRCA1* mohou zapříčinit nižší aktivitu translace a nižší aktivitu HR.
- Také byla potvrzena hypotéza, že nižší množství proteinu BRCA1 snižuje aktivitu HR.
- Zjištění této práce mohou sloužit jako základ pro budoucí snahy o klinickou klasifikaci variant nalezených v nekódujících oblastech genu *BRCA1*, jejichž počet se neustále zvyšuje.

Seznam obrázků

Číslo	Název	Strana
1	Časový vývoj incidence a mortality zhoubného novotvaru karcinomu prsu (C-50) v české populaci	8
2	Grafické schématické znázornění oblasti chromosomu 17 v blízkosti genu <i>BRCA1</i>	11
3	Struktura proteinu BRCA1 a jeho hlavní interakční partneři	12
4	Grafické znázornění průběhu opravy dvouřetězcového zlomu DNA mechanismem homologní rekombinace	16
5	Schématický obrázek cis regulačních oblastí genu <i>BRCA1</i>	23
6	Schématické znázornění pozice použitých sekvenčních alterací v donorové sekvenci pro modifikaci genu <i>BRCA1</i>	32
7	Část sekvence genu <i>BRCA1</i> , která bude vložena do plazmidu pSC A-amp/kan	38
8	Metodický postup pro vytvoření stabilně modifikovaných homozygotních a heterozygotních klonů pro analyzovanou variantu genu <i>BRCA1</i>	43
9	Princip stanovení aktivity homologní rekombinace pomocí reporterového „DR-GFP assay“	51
10	Aktivita HR byla stanovena v buňkách U2 OS pomocí průtokové cytometrie	52
11	Výsledky predikce specificity a efektivit navržené sgRNA	53
12	Výřez chromatogramu ze Sangerova sekvenování sekvence nukleotidů v CRISPR konstruktu px330Cas9	54
13	Zavedení synonymních sekvenčních alterací do donorové sekvence	55
14	Výřezy chromatogramů získaných ze Sangerova sekvenování donorového vektoru	56
15	Kontrola funkčnosti transfekce do buněk U2 OS	57
16	Výsledek restrikční analýzy směsných populací v agarózovém gelu	59
17	Restrikční analýza izolovaných „single cell“ kolonií IVS2 -3G>C	60
18	Výsledky Sangerova sekvenování klonů pro potvrzení přítomnosti stabilně zavedených modifikací v gDNA U2 OS buněk	61
19	Relativní exprese BRCA1 na úrovni mRNA v buňkách U2 OS modelového systému.	63
20	Relativní množství proteinu BRCA1 produkovaného buňkami U2 OS s vyšetřovanými sekvenčními alteracemi v nekódující části genu <i>BRCA1</i>	64
21	: Relativní aktivita homologní rekombinace v buňkách U2 OS s různými variantami genu <i>BRCA1</i>	66
22	Souvislost mezi mírou exprese genu <i>BRCA1</i> na úrovni mRNA a proteinu a aktivitou homologní rekombinace	74

Seznam tabulek

Číslo	Název	Strana
1	Efektivita zavádění modifikací.	62

Seznam použité literatury

- Abkevich, V., A. Zharkikh, A. M. Deffenbaugh, D. Frank, *et al.* (2004). "Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation." Journal of medical genetics **41**(7): 492-507.
- Anand, R., L. Ranjha, E. Cannavo and P. Cejka (2016). "Phosphorylated CtIP Functions as a Co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 Endonuclease in DNA End Resection." Molecular Cell **64**(5): 940-950.
- Anantha, R. W., S. Simhadri, T. K. Foo, S. Miao, *et al.* (2017). "Functional and mutational landscapes of BRCA1 for homology-directed repair and therapy resistance." eLife **6**.
- Atkinson, T. J. and M. S. Halfon (2014). "Regulation of gene expression in the genomic context." Computational and structural biotechnology journal **9**: e201401001.
- Atlas, E., M. Stramwasser and C. R. Mueller (2001). "A CREB site in the BRCA1 proximal promoter acts as a constitutive transcriptional element." Oncogene **20**(48): 7110-7114.
- Atlas, E., M. Stramwasser, K. Whiskin and C. R. Mueller (2000). "GA-binding protein alpha/beta is a critical regulator of the BRCA1 promoter." Oncogene **19**(15): 1933-1940.
- Baldeyron, C., E. Jacquemin, J. Smith, C. Jacquemont, *et al.* (2002). "A single mutated BRCA1 allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining." Oncogene **21**(9): 1401-1410.
- Bau, D. T., Y. P. Fu, S. T. Chen, T. C. Cheng, *et al.* (2004). "Breast cancer risk and the DNA double-strand break end-joining capacity of nonhomologous end-joining genes are affected by BRCA1." Cancer Res **64**(14): 5013-5019.
- Beger, C., L. N. Pierce, M. Kruger, E. G. Marcusson, *et al.* (2001). "Identification of Id4 as a regulator of BRCA1 expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(1): 130-135.
- Benson, F. E., A. Stasiak and S. C. West (1994). "Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA." The EMBO journal **13**(23): 5764-5771.
- Berkovich, E., R. J. Monnat, Jr. and M. B. Kastan (2007). "Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair." Nature cell biology **9**(6): 683-690.
- Bienstock, R. J., T. Darden, R. Wiseman, L. Pedersen, *et al.* (1996). "Molecular modeling of the amino-terminal zinc ring domain of BRCA1." Cancer Res **56**(11): 2539-2545.
- Bindra, R. S., S. L. Gibson, A. Meng, U. Westermark, *et al.* (2005). "Hypoxia-induced down-regulation of BRCA1 expression by E2Fs." Cancer Research **65**(24): 11597-11604.
- Bindra, R. S. and P. M. Glazer (2006). "Basal repression of BRCA1 by multiple E2Fs and pocket proteins at adjacent E2F sites." Cancer biology & therapy **5**(10): 1400-1407.
- Blier, P. R., A. J. Griffith, J. Craft and J. A. Hardin (1993). "Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks." The Journal of biological chemistry **268**(10): 7594-7601.
- Bouwman, P., H. van der Gulden, I. van der Heijden, R. Drost, *et al.* (2013). "A high-throughput functional complementation assay for classification of BRCA1 missense variants." Cancer discovery **3**(10): 1142-1155.
- Bray, F., J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, *et al.* (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA: a cancer journal for clinicians **68**(6): 394-424.
- Bretones, G., M. D. Delgado and J. Leon (2015). "Myc and cell cycle control." Biochimica et biophysica acta **1849**(5): 506-516.
- Brewster, B. L., F. Rossiello, J. D. French, S. L. Edwards, *et al.* (2012). "Identification of fifteen novel germline variants in the BRCA1 3'UTR reveals a variant in a breast cancer case that introduces a functional miR-103 target site." Human mutation **33**(12): 1665-1675.

- Broderick, R., J. Nieminuszczy, H. T. Baddock, R. Deshpande, *et al.* (2016). "EXD2 promotes homologous recombination by facilitating DNA end resection." Nature cell biology **18**(3): 271-280.
- Brown, M. A., C. F. Xu, H. Nicolai, B. Griffiths, *et al.* (1996). "The 5' end of the BRCA1 gene lies within a duplicated region of human chromosome 17q21." Oncogene **12**(12): 2507-2513.
- Brzovic, P. S., P. Rajagopal, D. W. Hoyt, M. C. King, *et al.* (2001). "Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex." Nat Struct Biol **8**(10): 833-837.
- Budhram-Mahadeo, V., D. Ndisang, T. Ward, B. L. Weber, *et al.* (1999). "The Brn-3b POU family transcription factor represses expression of the BRCA-1 anti-oncogene in breast cancer cells." Oncogene **18**(48): 6684-6691.
- Buis, J., T. Stoneham, E. Spehalski and D. O. Ferguson (2012). "Mre11 regulates CtIP-dependent double-strand break repair by interaction with CDK2." Nature structural & molecular biology **19**(2): 246-252.
- Burga, L. N., N. M. Tung, S. L. Troyan, M. Bostina, *et al.* (2009). "Altered proliferation and differentiation properties of primary mammary epithelial cells from BRCA1 mutation carriers." Cancer Research **69**(4): 1273-1278.
- Calza, S., P. Hall, G. Auer, J. Bjohle, *et al.* (2006). "Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients." Breast cancer research : BCR **8**(4): R34.
- Cantor, S. B., D. W. Bell, S. Ganesan, E. M. Kass, *et al.* (2001). "BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function." Cell **105**(1): 149-160.
- Cary, R. B., S. R. Peterson, J. Wang, D. G. Bear, *et al.* (1997). "DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(9): 4267-4272.
- Catteau, A., W. H. Harris, C. F. Xu and E. Solomon (1999). "Methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast and ovarian cancer: correlation with disease characteristics." Oncogene **18**(11): 1957-1965.
- Clarke, A. R., C. A. Purdie, D. J. Harrison, R. G. Morris, *et al.* (1993). "Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways." Nature **362**(6423): 849-852.
- Claus, E. B., N. Risch and W. D. Thompson (1994). "Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction." Cancer **73**(3): 643-651.
- Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, *et al.* (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science **339**(6121): 819-823.
- Corneo, B., R. L. Wendland, L. Deriano, X. Cui, *et al.* (2007). "Rag mutations reveal robust alternative end joining." Nature **449**(7161): 483-486.
- Cortez, D., Y. Wang, J. Qin and S. J. Elledge (1999). "Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks." Science **286**(5442): 1162-1166.
- Crick, F. H. (1952). "Is alpha-keratin a coiled coil?" Nature **170**(4334): 882-883.
- Cruz-Garcia, A., A. Lopez-Saavedra and P. Huertas (2014). "BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection." Cell reports **9**(2): 451-459.
- Daly, M. B., R. Pilarski, J. E. Axilbund, M. Berry, *et al.* (2016). "Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2015." Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN **14**(2): 153-162.
- Davies, A. A., J. Y. Masson, M. J. McIlwraith, A. Z. Stasiak, *et al.* (2001). "Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein." Molecular Cell **7**(2): 273-282.
- Davis, A. J., L. Chi, S. So, K. J. Lee, *et al.* (2014). "BRCA1 modulates the autophosphorylation status of DNA-PKcs in S phase of the cell cycle." Nucleic Acids Res **42**(18): 11487-11501.
- Day, D. A. and M. F. Tuite (1998). "Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview." The Journal of endocrinology **157**(3): 361-371.

- de Jager, M., J. van Noort, D. C. van Gent, C. Dekker, *et al.* (2001). "Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends." Molecular Cell **8**(5): 1129-1135.
- De Siervi, A., P. De Luca, J. S. Byun, L. J. Di, *et al.* (2010). "Transcriptional autoregulation by BRCA1." Cancer Research **70**(2): 532-542.
- Deng, Y., J. Liu, G. Han, S. L. Lu, *et al.* (2010). "Redox-dependent Brca1 transcriptional regulation by an NADH-sensor CtBP1." Oncogene **29**(50): 6603-6608.
- Di, L. J., A. G. Fernandez, A. De Siervi, D. L. Longo, *et al.* (2010). "Transcriptional regulation of BRCA1 expression by a metabolic switch." Nature structural & molecular biology **17**(12): 1406-1413.
- Dimitrov, S., M. Brennerova and J. Forejt (2001). "Expression profiles and intergenic structure of head-to-head oriented Brca1 and Nbr1 genes." Gene **262**(1-2): 89-98.
- DiNardo, D. N., D. T. Butcher, D. P. Robinson, T. K. Archer, *et al.* (2001). "Functional analysis of CpG methylation in the BRCA1 promoter region." Oncogene **20**(38): 5331-5340.
- Ding, Q., Y. V. Reddy, W. Wang, T. Woods, *et al.* (2003). "Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair." Molecular and Cellular Biology **23**(16): 5836-5848.
- Doench, J. G., N. Fusi, M. Sullender, M. Hegde, *et al.* (2016). "Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9." Nature biotechnology **34**(2): 184-191.
- Dohrn, L., D. Salles, S. Y. Siehler, J. Kaufmann, *et al.* (2012). "BRCA1-mediated repression of mutagenic end-joining of DNA double-strand breaks requires complex formation with BACH1." The Biochemical journal **441**(3): 919-926.
- Domagala, P., J. Hybiak, C. Cybulski and J. Lubinski (2017). "BRCA1/2-negative hereditary triple-negative breast cancers exhibit BRCAness." International journal of cancer **140**(7): 1545-1550.
- Dong, Y., M. A. Hakimi, X. Chen, E. Kumaraswamy, *et al.* (2003). "Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair." Molecular Cell **12**(5): 1087-1099.
- Dorairaj, J. J., D. W. Salzman, D. Wall, T. Rounds, *et al.* (2014). "A germline mutation in the BRCA1 3'UTR predicts Stage IV breast cancer." BMC cancer **14**: 421.
- Dos Santos, E. S., S. M. Caputo, L. Castera, M. Gendrot, *et al.* (2018). "Assessment of the functional impact of germline BRCA1/2 variants located in non-coding regions in families with breast and/or ovarian cancer predisposition." Breast cancer research and treatment **168**(2): 311-325.
- Duursma, A. M., R. Driscoll, J. E. Elias and K. A. Cimprich (2013). "A role for the MRN complex in ATR activation via TOPBP1 recruitment." Molecular Cell **50**(1): 116-122.
- Easton, D. and J. Peto (1990). "The contribution of inherited predisposition to cancer incidence." Cancer surveys **9**(3): 395-416.
- Easton, D. F., D. Ford and D. T. Bishop (1995). "Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium." American journal of human genetics **56**(1): 265-271.
- Escribano-Díaz, C., A. Orthwein, A. Fradet-Turcotte, M. Xing, *et al.* (2013). "A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice." Molecular Cell **49**(5): 872-883.
- Esteller, M., P. G. Corn, S. B. Baylin and J. G. Herman (2001). "A gene hypermethylation profile of human cancer." Cancer Research **61**(8): 3225-3229.
- Evans, D. G. R., E. M. van Veen, H. J. Byers, A. J. Wallace, *et al.* (2018). "A Dominantly Inherited 5' UTR Variant Causing Methylation-Associated Silencing of BRCA1 as a Cause of Breast and Ovarian Cancer." American journal of human genetics **103**(2): 213-220.
- Fabbro, M., J. A. Rodriguez, R. Baer and B. R. Henderson (2002). "BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and

- inhibiting BRCA1 nuclear export." The Journal of biological chemistry **277**(24): 21315-21324.
- Favy, D. A., P. Rio, J. C. Maurizis, C. Hizez, *et al.* (1999). "Prolactin-dependent up-regulation of BRCA1 expression in human breast cancer cell lines." Biochemical and Biophysical Research Communications **258**(2): 284-291.
- Feng, L., K. W. Fong, J. Wang, W. Wang, *et al.* (2013). "RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair." The Journal of biological chemistry **288**(16): 11135-11143.
- Feng, L., N. Li, Y. Li, J. Wang, *et al.* (2015). "Cell cycle-dependent inhibition of 53BP1 signaling by BRCA1." Cell Discov **1**: 15019.
- Ferretti, L. P., L. Lafranchi and A. A. Sartori (2013). "Controlling DNA-end resection: a new task for CDKs." Frontiers in genetics **4**: 99.
- Foray, N., D. Marot, A. Gabriel, V. Randrianarison, *et al.* (2003). "A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein." The EMBO journal **22**(11): 2860-2871.
- Ford, D., D. F. Easton, M. Stratton, S. Narod, *et al.* (1998). "Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium." American journal of human genetics **62**(3): 676-689.
- Foulkes, W. D., J. S. Brunet, I. M. Stefansson, O. Straume, *et al.* (2004). "The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer." Cancer Research **64**(3): 830-835.
- Fukasawa, K., F. Wiener, G. F. Vande Woude and S. Mai (1997). "Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice." Oncogene **15**(11): 1295-1302.
- Garcia, A. I., M. Buisson, P. Bertrand, R. Rimokh, *et al.* (2011). "Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers." EMBO molecular medicine **3**(5): 279-290.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." Journal of molecular biology **196**(2): 261-282.
- Gatei, M., B. B. Zhou, K. Hobson, S. Scott, *et al.* (2001). "Ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase and ATM and Rad3 related kinase mediate phosphorylation of Brca1 at distinct and overlapping sites. In vivo assessment using phospho-specific antibodies." The Journal of biological chemistry **276**(20): 17276-17280.
- Geospiza Inc.; Seattle, W., USA; <http://www.geospiza.com>. "FinchTV 1.5.0." from <https://digitalworldbiology.com/FinchTV>.
- Gowen, L. C., B. L. Johnson, A. M. Latour, K. K. Sulik, *et al.* (1996). "Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities." Nature Genetics **12**(2): 191-194.
- Grawunder, U., M. Wilm, X. Wu, P. Kulesza, *et al.* (1997). "Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells." Nature **388**(6641): 492-495.
- Griffiths, B. L., E. Solomon, H. Nicolai, J. A. Chambers, *et al.* (1997). "Isolation and Characterisation of the NBR2 Gene Which Lies Head to Head with the Human BRCA1 Gene." Human Molecular Genetics **6**(7): 1057-1062.
- Gu, J., H. Lu, B. Tippin, N. Shimazaki, *et al.* (2007). "XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps." The EMBO journal **26**(4): 1010-1023.
- Gu, J., H. Lu, A. G. Tsai, K. Schwarz, *et al.* (2007). "Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence." Nucleic Acids Research **35**(17): 5755-5762.
- Gudas, J. M., T. Li, H. Nguyen, D. Jensen, *et al.* (1996). "Cell cycle regulation of BRCA1 messenger RNA in human breast epithelial cells." Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research **7**(6): 717-723.

- Gudas, J. M., H. Nguyen, T. Li and K. H. Cowan (1995). "Hormone-dependent regulation of BRCA1 in human breast cancer cells." Cancer Research **55**(20): 4561-4565.
- Gupta, R., S. Sharma, J. A. Sommers, Z. Jin, *et al.* (2005). "Analysis of the DNA substrate specificity of the human BACH1 helicase associated with breast cancer." The Journal of biological chemistry **280**(27): 25450-25460.
- Haeussler, M., K. Schonig, H. Eckert, A. Eschstruth, *et al.* (2016). "Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR." Genome biology **17**(1): 148.
- Hagen, U. (1989). "Biochemical aspects of radiation biology." Experientia **45**(1): 7-12.
- Hakem, R., J. L. de la Pompa, A. Elia, J. Potter, *et al.* (1997). "Partial rescue of Brca1 (5-6) early embryonic lethality by p53 or p21 null mutation." Nature Genetics **16**(3): 298-302.
- Hakem, R., J. L. de la Pompa, C. Sirard, R. Mo, *et al.* (1996). "The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse." Cell **85**(7): 1009-1023.
- Hall, J., M. Lee, B. Newman, J. Morrow, *et al.* (1990). "Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21." Science **250**(4988): 1684-1689.
- Hamajima, N., K. Hirose, K. Tajima, T. Rohan, *et al.* (2002). "Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease." British journal of cancer **87**(11): 1234-1245.
- Hasan, A., C. Cotobal, C. D. Duncan and J. Mata (2014). "Systematic analysis of the role of RNA-binding proteins in the regulation of RNA stability." PLoS genetics **10**(11): e1004684.
- Hashizume, R., M. Fukuda, I. Maeda, H. Nishikawa, *et al.* (2001). "The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation." J Biol Chem **276**(18): 14537-14540.
- Hershko, A., H. Heller, S. Elias and A. Ciechanover (1983). "Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown." The Journal of biological chemistry **258**(13): 8206-8214.
- Hershko, A., H. Heller, E. Eytan and Y. Reiss (1986). "The protein substrate binding site of the ubiquitin-protein ligase system." The Journal of biological chemistry **261**(26): 11992-11999.
- Hockings, J. K., P. A. Thorne, M. Q. Kemp, S. S. Morgan, *et al.* (2006). "The ligand status of the aromatic hydrocarbon receptor modulates transcriptional activation of BRCA-1 promoter by estrogen." Cancer Research **66**(4): 2224-2232.
- Hu, Y. F., T. Miyake, Q. Ye and R. Li (2000). "Characterization of a novel trans-activation domain of BRCA1 that functions in concert with the BRCA1 C-terminal (BRCT) domain." The Journal of biological chemistry **275**(52): 40910-40915.
- Hutchison, C. A., 3rd, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, *et al.* (1978). "Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence." The Journal of biological chemistry **253**(18): 6551-6560.
- Chau, V., J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, *et al.* (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." Science **243**(4898): 1576-1583.
- Chen, C. F., S. Li, Y. Chen, P. L. Chen, *et al.* (1996). "The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor." The Journal of biological chemistry **271**(51): 32863-32868.
- Chen, J., D. P. Silver, D. Walpita, S. B. Cantor, *et al.* (1998). "Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells." Molecular Cell **2**(3): 317-328.
- Chen, L., C. J. Nievera, A. Y. Lee and X. Wu (2008). "Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair." The Journal of biological chemistry **283**(12): 7713-7720.
- Chen, L., K. Trujillo, P. Sung and A. E. Tomkinson (2000). "Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase." The Journal of biological chemistry **275**(34): 26196-26205.

- Chen, Y., A. A. Farmer, C. F. Chen, D. C. Jones, *et al.* (1996). "BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner." Cancer Res **56**(14): 3168-3172.
- Chen, Y., J. Xu, S. Borowicz, C. Collins, *et al.* (2011). "c-Myc activates BRCA1 gene expression through distal promoter elements in breast cancer cells." BMC cancer **11**: 246.
- Chu, V. T., T. Weber, B. Wefers, W. Wurst, *et al.* (2015). "Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells." Nature biotechnology **33**(5): 543-548.
- Iwabuchi, K., P. L. Bartel, B. Li, R. Murrain, *et al.* (1994). "Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(13): 6098-6102.
- Jeffy, B. D., J. K. Hockings, M. Q. Kemp, S. S. Morgan, *et al.* (2005). "An estrogen receptor-alpha/p300 complex activates the BRCA-1 promoter at an AP-1 site that binds Jun/Fos transcription factors: repressive effects of p53 on BRCA-1 transcription." Neoplasia **7**(9): 873-882.
- Jensen, R. B., A. Carreira and S. C. Kowalczykowski (2010). "Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination." Nature **467**(7316): 678-683.
- Jiang, G., I. Plo, T. Wang, M. Rahman, *et al.* (2013). "BRCA1-Ku80 protein interaction enhances end-joining fidelity of chromosomal double-strand breaks in the G1 phase of the cell cycle." The Journal of biological chemistry **288**(13): 8966-8976.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, *et al.* (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science **337**(6096): 816-821.
- Johnson, R. D. and M. Jasin (2000). "Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells." The EMBO journal **19**(13): 3398-3407.
- Kleiman, F. E., F. Wu-Baer, D. Fonseca, S. Kaneko, *et al.* (2005). "BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II." Genes & Development **19**(10): 1227-1237.
- Kluk, B. J., Y. Fu, T. A. Formolo, L. Zhang, *et al.* (2010). "BP1, an isoform of DLX4 homeoprotein, negatively regulates BRCA1 in sporadic breast cancer." International journal of biological sciences **6**(5): 513-524.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **68**(4): 820-823.
- Kochan, J. A., E. C. B. Desclos, R. Bosch, L. Meister, *et al.* (2017). "Meta-analysis of DNA double-strand break response kinetics." Nucleic Acids Research **45**(22): 12625-12637.
- Konishi, H., M. Mohseni, A. Tamaki, J. P. Garay, *et al.* (2011). "Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(43): 17773-17778.
- Koonin, E. V., S. F. Altschul and P. Bork (1996). "BRCA1 protein products ... Functional motifs." Nat Genet **13**(3): 266-268.
- Kozak, M. (1987). "An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs." Nucleic Acids Research **15**(20): 8125-8148.
- Kozak, M. (1987). "At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells." Journal of molecular biology **196**(4): 947-950.
- Kumaraswamy, E. and R. Shiekhattar (2007). "Activation of BRCA1/BRCA2-associated helicase BACH1 is required for timely progression through S phase." Molecular and Cellular Biology **27**(19): 6733-6741.
- Labun, K., T. G. Montague, M. Krause, Y. N. Torres Cleuren, *et al.* (2019). "CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing." Nucleic Acids Research **47**(W1): W171-W174.
- Lee, J. H. and T. T. Paull (2005). "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex." Science **308**(5721): 551-554.

- Lee, J. W., L. Blanco, T. Zhou, M. Garcia-Diaz, *et al.* (2004). "Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts." The Journal of biological chemistry **279**(1): 805-811.
- Lelli, K. M., M. Slattery and R. S. Mann (2012). "Disentangling the many layers of eukaryotic transcriptional regulation." Annual review of genetics **46**: 43-68.
- Li, X., C. M. Stith, P. M. Burgers and W. D. Heyer (2009). "PCNA is required for initiation of recombination-associated DNA synthesis by DNA polymerase delta." Molecular Cell **36**(4): 704-713.
- Lim, L. P., N. C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, *et al.* (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." Nature **433**(7027): 769-773.
- Lin, F. L., K. Sperle and N. Sternberg (1984). "Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process." Molecular and Cellular Biology **4**(6): 1020-1034.
- Lin, R., J. W. Leone, R. G. Cook and C. D. Allis (1989). "Antibodies specific to acetylated histones document the existence of deposition- and transcription-related histone acetylation in Tetrahymena." The Journal of cell biology **108**(5): 1577-1588.
- Liu, J., G. Prolla, A. Rostagno, R. Chiarle, *et al.* (2000). "Initiation of translation from a downstream in-frame AUG codon on BRCA1 can generate the novel isoform protein DeltaBRCA1(17aa)." Oncogene **19**(23): 2767-2773.
- Liu, P., W. Gan, S. Su, A. V. Hauenstein, *et al.* (2018). "K63-linked polyubiquitin chains bind to DNA to facilitate DNA damage repair." Science signaling **11**(533).
- Liu, V. F. and D. T. Weaver (1993). "The ionizing radiation-induced replication protein A phosphorylation response differs between ataxia telangiectasia and normal human cells." Molecular and Cellular Biology **13**(12): 7222-7231.
- Livasy, C. A., G. Karaca, R. Nanda, M. S. Tretiakova, *et al.* (2006). "Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma." Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc **19**(2): 264-271.
- Lovering, R., I. M. Hanson, K. L. Borden, S. Martin, *et al.* (1993). "Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(6): 2112-2116.
- Ma, Y., S. Fan, C. Hu, Q. Meng, *et al.* (2010). "BRCA1 regulates acetylation and ubiquitination of estrogen receptor-alpha." Mol Endocrinol **24**(1): 76-90.
- Ma, Y., U. Pannicke, K. Schwarz and M. R. Lieber (2002). "Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination." Cell **108**(6): 781-794.
- MacDonald, G., M. Stramwasser and C. R. Mueller (2007). "Characterization of a negative transcriptional element in the BRCA1 promoter." Breast cancer research : BCR **9**(4): R49.
- Magdinier, F., L. M. Billard, G. Wittmann, L. Frappart, *et al.* (2000). "Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **14**(11): 1585-1594.
- Mailand, N., S. Bekker-Jensen, H. Faustrup, F. Melander, *et al.* (2007). "RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins." Cell **131**(5): 887-900.
- Malkova, A., E. L. Ivanov and J. E. Haber (1996). "Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(14): 7131-7136.
- Mancini, D. N., D. I. Rodenhiser, P. J. Ainsworth, F. P. O'Malley, *et al.* (1998). "CpG methylation within the 5' regulatory region of the BRCA1 gene is tumor specific and includes a putative CREB binding site." Oncogene **16**(9): 1161-1169.
- Mao, Z., M. Bozzella, A. Seluanov and V. Gorbunova (2008). "Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells." DNA repair **7**(10): 1765-1771.

- Marks, J. R., G. Huper, J. P. Vaughn, P. L. Davis, *et al.* (1997). "BRCA1 expression is not directly responsive to estrogen." *Oncogene* **14**(1): 115-121.
- Martins, F. C., S. De, V. Almendro, M. Gonen, *et al.* (2012). "Evolutionary pathways in BRCA1-associated breast tumors." *Cancer discovery* **2**(6): 503-511.
- Maruyama, T., S. K. Dougan, M. C. Truttmann, A. M. Bilate, *et al.* (2015). "Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining." *Nature biotechnology* **33**(5): 538-542.
- Matamala, N., M. T. Vargas, R. Gonzalez-Campora, J. I. Arias, *et al.* (2016). "MicroRNA deregulation in triple negative breast cancer reveals a role of miR-498 in regulating BRCA1 expression." *Oncotarget* **7**(15): 20068-20079.
- Meza, J. E., P. S. Brzovic, M. C. King and R. E. Klevit (1999). "Mapping the functional domains of BRCA1. Interaction of the ring finger domains of BRCA1 and BARD1." *The Journal of biological chemistry* **274**(9): 5659-5665.
- Miki, Y., J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P. A. Futreal, *et al.* (1994). "A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1." *Science* **266**(5182): 66-71.
- Mirzoeva, O. K. and J. H. Petrini (2001). "DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex." *Molecular and Cellular Biology* **21**(1): 281-288.
- Molyneux, G., F. C. Geyer, F. A. Magnay, A. McCarthy, *et al.* (2010). "BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells." *Cell stem cell* **7**(3): 403-417.
- Moon, A. F., J. M. Pryor, D. A. Ramsden, T. A. Kunkel, *et al.* (2014). "Sustained active site rigidity during synthesis by human DNA polymerase mu." *Nature structural & molecular biology* **21**(3): 253-260.
- Morle, F., J. Starck and J. Godet (1986). "Alpha-thalassemia due to the deletion of nucleotides -2 and -3 preceding the AUG initiation codon affects translation efficiency both in vitro and in vivo." *Nucleic Acids Research* **14**(8): 3279-3292.
- Moynahan, M. E., J. W. Chiu, B. H. Koller and M. Jasin (1999). "Brca1 controls homology-directed DNA repair." *Mol Cell* **4**(4): 511-518.
- Nakamura, K., W. Sakai, T. Kawamoto, R. T. Bree, *et al.* (2006). "Genetic dissection of vertebrate 53BP1: a major role in non-homologous end joining of DNA double strand breaks." *DNA repair* **5**(6): 741-749.
- Nassif, N., J. Penney, S. Pal, W. R. Engels, *et al.* (1994). "Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair." *Molecular and Cellular Biology* **14**(3): 1613-1625.
- Nimonkar, A. V., J. Genschel, E. Kinoshita, P. Polaczek, *et al.* (2011). "BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair." *Genes & Development* **25**(4): 350-362.
- Nimonkar, A. V., A. Z. Ozsoy, J. Genschel, P. Modrich, *et al.* (2008). "Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(44): 16906-16911.
- Niwa, Y., T. Oyama and T. Nakajima (2000). "BRCA1 expression status in relation to DNA methylation of the BRCA1 promoter region in sporadic breast cancers." *Japanese journal of cancer research : Gann* **91**(5): 519-526.
- Noderer, W. L., R. J. Flockhart, A. Bhaduri, A. J. Diaz de Arce, *et al.* (2014). "Quantitative analysis of mammalian translation initiation sites by FACS-seq." *Molecular systems biology* **10**: 748.
- Oberley, M. J., D. R. Inman and P. J. Farnham (2003). "E2F6 negatively regulates BRCA1 in human cancer cells without methylation of histone H3 on lysine 9." *The Journal of biological chemistry* **278**(43): 42466-42476.
- Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard, *et al.* (1996). "The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases." *Cell* **87**(5): 953-959.
- Pelletier, C., W. C. Speed, T. Paranjape, K. Keane, *et al.* (2011). "Rare BRCA1 haplotypes including 3'UTR SNPs associated with breast cancer risk." *Cell cycle* **10**(1): 90-99.

- Perou, C. M., T. Sorlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, *et al.* (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." Nature **406**(6797): 747-752.
- Pettigrew, C. A., J. D. French, J. M. Saunus, S. L. Edwards, *et al.* (2010). "Identification and functional analysis of novel BRCA1 transcripts, including mouse Brca1-Iris and human pseudo-BRCA1." Breast cancer research and treatment **119**(1): 239-247.
- Pierce, A. J., R. D. Johnson, L. H. Thompson and M. Jasin (1999). "XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells." Genes & Development **13**(20): 2633-2638.
- Pinder, J., J. Salsman and G. Dellaire (2015). "Nuclear domain 'knock-in' screen for the evaluation and identification of small molecule enhancers of CRISPR-based genome editing." Nucleic Acids Research **43**(19): 9379-9392.
- Plon, S. E., D. M. Eccles, D. Easton, W. D. Foulkes, *et al.* (2008). "Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results." Human mutation **29**(11): 1282-1291.
- Pohlreich, P., J. Stribrna, Z. Kleibl, M. Zikan, *et al.* (2003). "Mutations of the BRCA1 gene in hereditary breast and ovarian cancer in the Czech Republic." Medical principles and practice : international journal of the Kuwait University, Health Science Centre **12**(1): 23-29.
- Polato, F., E. Callen, N. Wong, R. Faryabi, *et al.* (2014). "CtIP-mediated resection is essential for viability and can operate independently of BRCA1." The Journal of experimental medicine **211**(6): 1027-1036.
- Pongsavee, M., V. Yamkamon, S. Dakeng, O. c. P, *et al.* (2009). "The BRCA1 3'-UTR: 5711+421T/T_5711+1286T/T genotype is a possible breast and ovarian cancer risk factor." Genetic testing and molecular biomarkers **13**(3): 307-317.
- Proia, T. A., P. J. Keller, P. B. Gupta, I. Klebba, *et al.* (2011). "Genetic predisposition directs breast cancer phenotype by dictating progenitor cell fate." Cell stem cell **8**(2): 149-163.
- ProteinAtlas. (2019). "Tissue expression of BRCA1." from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000012048-BRCA1/tissue>.
- Puget, N., M. Knowlton and R. Scully (2005). "Molecular analysis of sister chromatid recombination in mammalian cells." DNA repair **4**(2): 149-161.
- Rahman, N., S. Seal, D. Thompson, P. Kelly, *et al.* (2007). "PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene." Nature Genetics **39**(2): 165-167.
- Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, *et al.* (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." Nature protocols **8**(11): 2281-2308.
- Rauch, T., X. Zhong, G. P. Pfeifer and X. Xu (2005). "53BP1 is a positive regulator of the BRCA1 promoter." Cell cycle **4**(8): 1078-1083.
- Reczek, C. R., M. Szabolcs, J. M. Stark, T. Ludwig, *et al.* (2013). "The interaction between CtIP and BRCA1 is not essential for resection-mediated DNA repair or tumor suppression." The Journal of cell biology **201**(5): 693-707.
- Rice, J. C. and B. W. Futscher (2000). "Transcriptional repression of BRCA1 by aberrant cytosine methylation, histone hypoacetylation and chromatin condensation of the BRCA1 promoter." Nucleic Acids Research **28**(17): 3233-3239.
- Rice, J. C., H. Ozelik, P. Maxeiner, I. Andrulis, *et al.* (2000). "Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens." Carcinogenesis **21**(9): 1761-1765.
- Rodriguez, J. A. and B. R. Henderson (2000). "Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1." The Journal of biological chemistry **275**(49): 38589-38596.
- Rogakou, E. P., C. Boon, C. Redon and W. M. Bonner (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." The Journal of cell biology **146**(5): 905-916.
- Ruffner, H. and I. M. Verma (1997). "BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein." Proceedings of the National Academy of Sciences **94**(14): 7138-7143.

- Ryan, A. J., S. Squires, H. L. Strutt and R. T. Johnson (1991). "Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA." Nucleic Acids Research **19**(12): 3295-3300.
- Sankaran, S., D. E. Crone, R. E. Palazzo and J. D. Parvin (2007). "BRCA1 regulates gamma-tubulin binding to centrosomes." Cancer biology & therapy **6**(12): 1853-1857.
- Sartori, A. A., C. Lukas, J. Coates, M. Mistrik, *et al.* (2007). "Human CtIP promotes DNA end resection." Nature **450**(7169): 509-514.
- Savage, K. I., K. B. Matchett, E. M. Barros, K. M. Cooper, *et al.* (2014). "BRCA1 deficiency exacerbates estrogen-induced DNA damage and genomic instability." Cancer Research **74**(10): 2773-2784.
- Sealy, L. and R. Chalkley (1978). "DNA associated with hyperacetylated histone is preferentially digested by DNase I." Nucleic Acids Research **5**(6): 1863-1876.
- Sedic, M., A. Skibinski, N. Brown, M. Gallardo, *et al.* (2015). "Haploinsufficiency for BRCA1 leads to cell-type-specific genomic instability and premature senescence." Nature communications **6**: 7505.
- Shibata, A., D. Moiani, A. S. Arvai, J. Perry, *et al.* (2014). "DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities." Molecular Cell **53**(1): 7-18.
- Shiozaki, E. N., L. Gu, N. Yan and Y. Shi (2004). "Structure of the BRCT repeats of BRCA1 bound to a BACH1 phosphopeptide: implications for signaling." Molecular Cell **14**(3): 405-412.
- Signori, E., C. Bagni, S. Papa, B. Primerano, *et al.* (2001). "A somatic mutation in the 5'UTR of BRCA1 gene in sporadic breast cancer causes down-modulation of translation efficiency." Oncogene **20**(33): 4596-4600.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, *et al.* (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Analytical biochemistry **150**(1): 76-85.
- Snouwaert, J. N., L. C. Gowen, A. M. Latour, A. R. Mohn, *et al.* (1999). "BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a brca1 transgene." Oncogene **18**(55): 7900-7907.
- Sobczak, K. and W. J. Krzyzosiak (2002). "Structural determinants of BRCA1 translational regulation." The Journal of biological chemistry **277**(19): 17349-17358.
- Sobhian, B., G. Shao, D. R. Lilli, A. C. Culhane, *et al.* (2007). "RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites." Science **316**(5828): 1198-1202.
- Sodha, N., S. Bullock, R. Taylor, G. Mitchell, *et al.* (2002). "CHEK2 variants in susceptibility to breast cancer and evidence of retention of the wild type allele in tumours." British journal of cancer **87**(12): 1445-1448.
- Sorlie, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, *et al.* (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(19): 10869-10874.
- Sorlie, T., R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, *et al.* (2003). "Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(14): 8418-8423.
- Spencer, T. E., G. Jenster, M. M. Burcin, C. D. Allis, *et al.* (1997). "Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase." Nature **389**(6647): 194-198.
- Starita, L. M., Y. Machida, S. Sankaran, J. E. Elias, *et al.* (2004). "BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number." Molecular and Cellular Biology **24**(19): 8457-8466.
- Stewart, G. S., B. Wang, C. R. Bignell, A. M. Taylor, *et al.* (2003). "MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint." Nature **421**(6926): 961-966.
- Stucki, M., J. A. Clapperton, D. Mohammad, M. B. Yaffe, *et al.* (2005). "MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks." Cell **123**(7): 1213-1226.

- Suen, T. C. and P. E. Goss (2001). "Identification of a novel transcriptional repressor element located in the first intron of the human BRCA1 gene." Oncogene **20**(4): 440-450.
- Suen, T. C., M. S. Tang and P. E. Goss (2005). "Model of transcriptional regulation of the BRCA1-NBR2 bi-directional transcriptional unit." Biochimica et biophysica acta **1728**(3): 126-134.
- Sung, P. and D. L. Robberson (1995). "DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA." Cell **82**(3): 453-461.
- Sy, S. M., M. S. Huen and J. Chen (2009). "PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(17): 7155-7160.
- Szankasi, P. and G. R. Smith (1992). "A DNA exonuclease induced during meiosis of *Schizosaccharomyces pombe*." The Journal of biological chemistry **267**(5): 3014-3023.
- Takata, M., M. S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, *et al.* (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." The EMBO journal **17**(18): 5497-5508.
- Thompson, D., S. Duedal, J. Kirner, L. McGuffog, *et al.* (2005). "Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers." Journal of the National Cancer Institute **97**(11): 813-822.
- Tibbetts, R. S., D. Cortez, K. M. Brumbaugh, R. Scully, *et al.* (2000). "Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress." Genes & Development **14**(23): 2989-3002.
- Towler, W. I., J. Zhang, D. J. Ransburgh, A. E. Toland, *et al.* (2013). "Analysis of BRCA1 variants in double-strand break repair by homologous recombination and single-strand annealing." Human mutation **34**(3): 439-445.
- Turner, J. and M. Crossley (1998). "Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators." The EMBO journal **17**(17): 5129-5140.
- UCSC, G. B. "UCSC Genome Browser." Retrieved 23.2., 2019, from <http://genome.ucsc.edu/>.
- Uhlen, M., L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, *et al.* (2015). "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome." Science **347**(6220): 1260419.
- Vaughn, J. P., P. L. Davis, M. D. Jarboe, G. Huper, *et al.* (1996). "BRCA1 expression is induced before DNA synthesis in both normal and tumor-derived breast cells." Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research **7**(6): 711-715.
- Wang, A., R. Schneider-Broussard, A. P. Kumar, M. C. MacLeod, *et al.* (2000). "Regulation of BRCA1 expression by the Rb-E2F pathway." The Journal of biological chemistry **275**(6): 4532-4536.
- Wang, B., K. Hurov, K. Hofmann and S. J. Elledge (2009). "NBA1, a new player in the Brcal A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control." Genes & Development **23**(6): 729-739.
- Wang, B., S. Matsuoka, B. A. Ballif, D. Zhang, *et al.* (2007). "Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response." Science **316**(5828): 1194-1198.
- Wang, J., C. Lu, D. Min, Z. Wang, *et al.* (2007). "A mutation in the 5' untranslated region of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer causes downregulation of translation efficiency." The Journal of international medical research **35**(4): 564-573.
- Ward, I., J. E. Kim, K. Minn, C. C. Chini, *et al.* (2006). "The tandem BRCT domain of 53BP1 is not required for its repair function." The Journal of biological chemistry **281**(50): 38472-38477.
- Wardrop, S. L. and M. A. Brown (2005). "Identification of two evolutionarily conserved and functional regulatory elements in intron 2 of the human BRCA1 gene." Genomics **86**(3): 316-328.
- Waters, R. (2006). "Maintaining genome integrity." EMBO reports **7**(4): 377-381.

- Williams, R. S., R. Green and J. N. Glover (2001). "Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1." Nature structural biology **8**(10): 838-842.
- Williams, R. S., M. S. Lee, D. D. Hau and J. N. Glover (2004). "Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1." Nature structural & molecular biology **11**(6): 519-525.
- Wold, M. S. and T. Kelly (1988). "Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(8): 2523-2527.
- Wu, L. C., Z. W. Wang, J. T. Tsan, M. A. Spillman, *et al.* (1996). "Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product." Nat Genet **14**(4): 430-440.
- Xia, B., Q. Sheng, K. Nakanishi, A. Ohashi, *et al.* (2006). "Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2." Molecular Cell **22**(6): 719-729.
- Xu, B., A. H. O'Donnell, S. T. Kim and M. B. Kastan (2002). "Phosphorylation of serine 1387 in Brcal is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation." Cancer Res **62**(16): 4588-4591.
- Xu, C. F., M. A. Brown, J. A. Chambers, B. Griffiths, *et al.* (1995). "Distinct transcription start sites generate two forms of BRCA1 mRNA." Human Molecular Genetics **4**(12): 2259-2264.
- Xu, C. F., J. A. Chambers and E. Solomon (1997). "Complex regulation of the BRCA1 gene." The Journal of biological chemistry **272**(34): 20994-20997.
- Yan, J., Y. S. Kim, X. P. Yang, M. Albers, *et al.* (2007). "Ubiquitin-interaction motifs of RAP80 are critical in its regulation of estrogen receptor alpha." Nucleic Acids Research **35**(5): 1673-1686.
- Yang, X. J. and E. Seto (2003). "Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression." Current opinion in genetics & development **13**(2): 143-153.
- Yu, X. and J. Chen (2004). "DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains." Molecular and Cellular Biology **24**(21): 9478-9486.
- Yu, X., C. C. Chini, M. He, G. Mer, *et al.* (2003). "The BRCT domain is a phospho-protein binding domain." Science **302**(5645): 639-642.
- Yu, X., L. C. Wu, A. M. Bowcock, A. Aronheim, *et al.* (1998). "The C-terminal (BRCT) domains of BRCA1 interact in vivo with CtIP, a protein implicated in the CtBP pathway of transcriptional repression." The Journal of biological chemistry **273**(39): 25388-25392.
- Yuan, S. S., S. Y. Lee, G. Chen, M. Song, *et al.* (1999). "BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo." Cancer Research **59**(15): 3547-3551.
- Yun, M. H. and K. Hiom (2009). "CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle." Nature **459**(7245): 460-463.
- Zhang, F., Q. Fan, K. Ren and P. R. Andreassen (2009). "PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2." Molecular cancer research : MCR **7**(7): 1110-1118.
- Zhang, F., J. Ma, J. Wu, L. Ye, *et al.* (2009). "PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response." Current biology : CB **19**(6): 524-529.
- Zhong, Q., C. F. Chen, P. L. Chen and W. H. Lee (2002). "BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks." The Journal of biological chemistry **277**(32): 28641-28647.
- Zimmermann, M., F. Lottersberger, S. B. Buonomo, A. Sfeir, *et al.* (2013). "53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection." Science **339**(6120): 700-704.