

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Jan Hojný

Analýza a charakterizace sestřihových variant BRCA1

Analysis and characterization of BRCA1 splicing variants

Diplomová práce

Školitel: Doc. MUDr. Zdeněk Kleibl Ph.D.

Praha 2012

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval mému školiteli Doc. MUDr. Zdeňku Kleiblovi, Ph.D., MUDr. Petře Kleiblové, Ph.D. a ostatním členům výzkumného týmu za pomoc, cenné rady, ochotu a trpělivost, které mi poskytli při vedení a psaní této práce. Dále bych rád poděkoval své rodině a přítelkyni za trpělivost a podporu.

Práce na projektu byla podpořena granty IGA NT12280; GAUK 428711, GAČR P301/12/1850 a projektem PRVOUK-P27/LF1/1.

Prohlášení

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

V Praze, 9. 5. 2012

Podpis

ABSTRAKT

Breast cancer gene 1 (BRCA1) kóduje jaderný fosfoprotein, jehož základní funkce spočívá v regulaci odpovědi na poškození genomové DNA. Protein BRCA1 se podílí na vzniku a funkci proteinových superkomplexů, které se účastní reparace dvouřetězcových zlomů. Tyto superkomplexy vznikají na základě protein-proteinových interakcí mezi vysoce konzervativními doménami proteinu BRCA1 a jeho vazebnými partnery. Kromě divoké formy (wt) BRCA1 mRNA obsahující všech 22 exonů kódujících protein o velikosti 220 kD, byla popsána řada alternativních sestřihových variant (ASV) BRCA1 mRNA, které dávají vzniknout proteinovým izoformám postrádajícím významné strukturní domény. Předpokládá se, že vznik ASV BRCA1 mRNA je jednou z možností regulace funkce BRCA1 proteinu.

Do současné doby není znám komplexní profil ASV BRCA1 ve fyziologických tkáních či míra a tkáňová specifita jejich exprese. Studium těchto aspektů bylo náplní této práce.

Na vzorcích celkové RNA jsme optimalizovali postup identifikace ASV BRCA1 včetně celých transkriptů wt BRCA1 s délkou přes 5,5 kb. V následně vyšetřovaných vzorcích RNA izolované z periferní krve pacientek s karcinomem prsu a žen bez nádorového onemocnění jsme vedle wt formy identifikovali celkem 13 ASV BRCA1 mRNA. Většina (9/13) identifikovaných ASV BRCA1 reprezentovala formy se zachovaným čtecím rámcem. Expresi pěti nejčastějších ASV BRCA1 jsme následně kvantifikovali ve vzorcích RNA izolovaných z lymfocytů periferní krve a z nenádorové mamární a tukové tkáně pacientek s karcinomem prsu a kontrol pomocí qPCR. Výsledky kvantifikací ukázaly, že identifikované ASV BRCA1 (s výjimkou BRCA1 Δ 8-9) jsou exprimovány ve vyšetřovaných vzorcích velmi omezeně. Jejich podíl na celkové expresi, které dominuje wt forma BRCA1 mRNA, nepřesahuje 5 %.

Doposud získané výsledky naznačují, že přítomnost ASV BRCA1 mRNA ve vyšetřovaných vzorcích je četná, avšak jejich zastoupení je minimální. Otázkou řešenou v návaznosti na výsledky stávajících analýz bude studium dynamiky změn exprese ASV BRCA1 mRNA především po genotoxickém poškození DNA.

Klíčová slova: BRCA1, karcinom prsu, alternativní sestřih, analýza genové exprese

ABSTRACT

The Breast cancer gene 1 (BRCA1) codes for nuclear phosphoprotein with a key function in the regulation of DNA damage response. The BRCA1 protein contributes to the formation and regulation of protein supercomplexes that participates on the DNA double-strand break repair. These protein supercomplexes are formed by the protein-protein interactions between highly conservative protein motives in BRCA1 and its binding partners. Except to the wild type form of BRCA1 mRNA containing entire set of 22 exons coding for the 220 kD protein, numerous alternative splicing variants (ASVs) BRCA1 mRNA has been described. These ASVs code for BRCA1 isoforms lacking several critical functional domains. It has been proposed, that formation of BRCA1's ASVs represent a tool for regulation of BRCA1 function.

Only poorly has been characterized a complex catalogue of in various human tissues and their expression. This study aims to address these questions.

We optimized the identification of BRCA1's ASVs including those covering the entire transcripts of the wt BRCA1 mRNA with length exceeding 5.5 kb. In further analysis, we characterized 13 BRCA1's ASVs in RNA samples isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMNC) obtained from patients with breast cancer (BC) and control subjects. The majority of the identified ASVs (9/13) retained the original ORF of BRCA1. The expressions of five selected ASVs were quantified in PBMNC and non-tumor mammary and adipose tissues obtained from BC patients and controls using qPCR. The results of qPCR analyses show the low expression of analyzed BRCA1's ASVs with the exception of BRCA1 Δ 8-9. The ratio of mRNA ASVs was below 5 % of total BRCA1 mRNA expression.

Our results indicate that numerous ASVs of BRCA1 mRNA occur in analyzed samples, but their expression is extremely low. Further, we are planning to analyze the dynamics of BRCA1's ASVs changes, especially following the genotoxic insults.

Key words: BRCA1, breast cancer, alternative splicing, gene expression analysis

OBSAH

Abstrakt	3
Abstract.....	4
Obsah.....	5
1 Úvod.....	8
1.1 Sestřih prekurzorové mRNA.....	8
1.1.1 Mechanismus sestřihu.....	9
1.1.2 Alternativní RNA sestřih – funkce a význam	10
1.1.2.1 Alternativní sestřih – regulace	12
1.2 Lokalizace a struktura genu BRCA1.....	13
1.2.1 BRCA1 mRNA	13
1.3 Funkční domény proteinu BRCA1.....	15
1.3.1 RING finger doména.....	16
1.3.2 BRCT (BRCA1 C-terminální) domény.....	17
1.3.3 Sekvence pro jaderné lokalizační signály (NLS).....	18
1.3.4 Doména obsahující serinové zbytky (Serine-containing domain; SCD).....	19
1.3.5 DNA vazebná doména (DBD)	20
1.3.6 Doména s funkcí aktivace transkripce	20
1.4 Funkce proteinu BRCA1	20
1.4.1 Tvorba BRCA1 superkomplexů.....	21
1.4.1.1 BRCA1/BARD1 „Core complex“ (CC).....	21
1.4.1.2 BRCA1 A komplex.....	23
1.4.1.3 BRCA1 B komplex	23
1.4.1.4 BRCA1 C komplex.....	24
1.4.1.5 BRCC komplex.....	24

1.4.2	Úloha BRCA1 v zachování genomové integrity	25
1.4.2.1	Signalizace poškození genomové DNA ATM a ATR kinázou	25
1.4.2.2	Úloha BRCA1 v opravě DNA homologní rekombinací.....	27
1.4.2.3	Úloha BRCA1 v opravě DNA pomocí NHEJ	28
1.4.2.3.1	Konzervativní NHEJ.....	29
1.4.2.3.2	Alternativní NHEJ	30
2	Cíle práce.....	32
3	Materiál a metody.....	33
3.1	Strategie řešení	33
3.2	Genetický materiál	33
3.2.1	Charakteristika buněčné linie MCF-7	33
3.2.2	Biologické vzorky od pacientek s karcinomem prsu a kontrol	34
3.3	Izolace a kvantifikace celkové RNA, příprava cDNA	34
3.3.1	Izolace celkové RNA z tkáňových vzorků	34
3.3.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace RNA	35
3.3.3	Měření kvality izolované RNA	35
3.3.4	Syntéza cDNA (reverzní transkripce)	36
3.4	Amplifikace ASV BRCA1	37
3.4.1	Návrh primerů pro PCR amplifikaci BRCA1 z cDNA a sekvenování	37
3.4.2	PCR amplifikace sestřihových variant BRCA1	38
3.4.3	Elektroforéza PCR amplikonů	39
3.4.4	Izolace fragmentů DNA z gelu, purifikace a reamplifikace.....	40
3.5	Charakterizace ASV BRCA1	40
3.5.1	Sekvence DNA	40
3.5.2	Restrikční analýza	40
3.6	Kvantifikace exprese ASV BRCA1 pomocí qPCR.....	41
3.6.1	Příprava qPCR analýzy ASV BRCA1:	42

3.6.2	Příprava kalibračních křivek	43
3.6.3	Kvantifikace změn exprese jednotlivých ASV a jejich statistické vyhodnocení	44
4	Výsledky.....	46
4.1	Optimalizace systému pro identifikaci ASV BRCA1	46
4.1.1	Optimalizace izolace RNA ze tkání	46
4.1.2	Optimalizace reverzní transkripce.....	47
4.1.3	Optimalizace průběhu PCR amplifikace	49
4.1.4	Optimalizace primerů pro charakterizaci ASV BRCA1	50
4.1.5	Elektroforetická separace amplikonů se sestřihovými variantami	52
4.1.6	Identifikace sestřihových variant pomocí restrikční analýzy	54
4.2	Identifikace sestřihových variant BRCA1 v biologických vzorcích	55
4.2.1	Výsledky izolace RNA	55
4.2.2	Identifikace sestřihových variant BRCA1 exprimovaných v leukocytech	56
4.3	Kvantifikace sestřihových variant BRCA1 v biologických vzorcích	62
4.3.1	Stanovení efektivity qPCR a detekčního rozmezí metody	62
4.3.2	Exprese vybraných ASV BRCA1 ve vzorcích tkání.....	64
5	Diskuze.....	67
6	Seznam použitých zkratk.....	74
7	Seznam použité literatury	76

1 ÚVOD

Od roku 1990, kdy byla prvotně lokalizována oblast výskytu genu *BRCA1*, a roku 1994, kdy bylo přesné umístění genu konečně objeveno, uběhlo téměř čtvrt století. Přes vše, co se o tomto genu a jeho proteinovému produktu podařilo za dobu jeho výzkumu zjistit, však zůstává řada nezodpovězených otázek. Jednou z těchto otázek je i význam a funkce alternativních sestřihových variant mRNA *BRCA1*, které po dlouhou dobu, ač detekovány, zůstávaly mimo zájem výzkumných týmů. Teprve v několika posledních letech je sestřihovým variantám mRNA *BRCA1* věnována větší pozornost.

Na našem pracovišti bylo během několika minulých let při rutinních vyšetření pacientek na mutace v genu *BRCA1* pozorováno velké množství alternativních sestřihových variant tohoto genu (Pohlreich et al., 2006), jejichž význam je nejasný. Má práce „*Analýza a charakterizace sestřihových variant BRCA1*“ je tak úvodním krokem k objasnění významu a funkce různých sestřihových variant *BRCA1*.

1.1 Sestřih prekurzorové mRNA

Základními funkčními strukturami eukaryotických genů jsou exony a introny - úseky sekvence genomové DNA rozdělené podle toho, zda se přepíší do mRNA (exony), nebo jsou vystřiženy a degradovány (introny). První fází exprese genetické informace z jednotlivých genů je její transkripce z DNA do RNA. Tímto přepisem vzniká tzv. primární transkript, což je přesná kopie exprimujícího se genu obsahující exony, introny i přilehlé oblasti, která se nazývá prekurzorová mRNA (pre-mRNA). Tato pre-mRNA je následně upravována v několika krocích, mezi které patří vytvoření 5' čepičky, sestřih a syntéza 3' poly-A konce. Po těchto úpravách vznikne finální produkt – mediátorová RNA (mRNA; messenger RNA) obsahující celistvou kódující sekvenci definující čtecí rámec pro syntézu příslušného proteinu (Alberts et al., 2008).

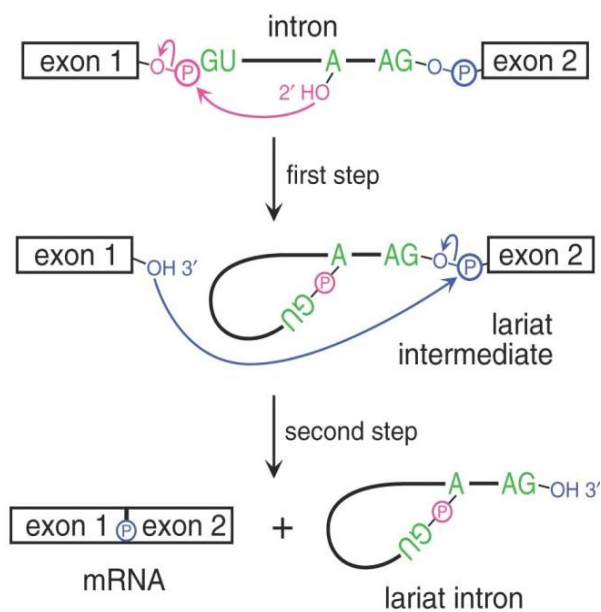
Pro překlad z mRNA do proteinové sekvence je potřeba mít jednotnou kódující sekvenci zbavenou vmezeřených úseků intronů, což se děje procesem zvaným sestřih pre-mRNA. Sestřih je jednou z prvních úprav pre-mRNA a začíná ihned po nasyntetizování prvního úseku určeného k sestřihu, zatímco zbytek pre-mRNA se teprve syntetizuje. Při sestřihu jsou introny

vystříženy z pre-mRNA a vzniká tak sekvence složená jen z 5'- a 3'-nepřekládaných oblastí (UTR - untranslated region) a celistvé kódující sekvence (viz Obr. 1; Pollard a Earnshaw, 2008; Alberts et al., 2008).

1.1.1 Mechanismus sestřihu

Třeba že k sestřihu pre-mRNA může dojít i autokatalytickým mechanismem, v eukaryontních buňkách je sestřih pre-mRNA realizován za pomoci specifického multiproteinového komplexu – spliceosomu. Tento makromolekulární aparát obsahuje přes 200 proteinů, které jsou nutné pro zajištění dostatečné komplexity a flexibility systému a umožňují tak celému spliceosomu velmi přesně a rychle rozeznávat a vystřihávat velké množství různých intronů, vyskytujících se v eukaryotickém organismu (Alberts et al., 2008). Katalytické jádro sestřihového aparátu tvoří pět základních sestřihových faktorů – U1, U2, U4, U5 a U6. Tyto malé ribonukleoproteiny (snRNP – small ribonucleoprotein particles) obsahují krátké jaderné RNA sekvence (snRNA – small nuclear RNA) účastnící se především rozpoznávání sestřihových míst lokalizovaných v intronu. Proteiny U1 – U6 se ko-transkripčně vážou na nově syntetizovanou pre-mRNA. Společně zajišťují základní funkce sestřihu: a) rozeznání sestřihových míst a místa větvení v intronu, b) enzymatickou aktivitu celého procesu.

Při každé sestřihové události dochází k dynamickým změnám struktury sestřihového aparátu v jejichž důsledku se přiblíží a spojí dva exony za současného vystřížení intronového úseku ležícího mezi těmito exony ve formě smyčky (lariat; Alberts et al., 2008). První fází sestřihové události je rozeznání 5' sestřihového místa ribonukleoproteinem U1, místa větvení proteinem BBP (branch-point binding protein; vazebný protein na místo větvení) a místa polypyrimidinového traktu U2AF (U2 auxiliary factor; pomocný faktor U2). V druhé fázi je nahrazen BBP v místě větvení ribonukleoproteinem U2, který vytvoří komplex s U2AF. V další fázi vstoupí do reakce trojice snRNP (U4/U6 a U5) a dojde k přestavbě celého komplexu za přiblížení U1 a U2 asociovaných s pre-mRNA. Tímto je umožněna první transesterifikační reakce (vznik smyčky) mezi 5' koncem intronu a adenosinem v místě větvení. Po vzniku smyčky dochází znovu k přestavbě komplexu za rozpadu U4/U6 heterodimeru umožňující nahrazení U1 v 5' sestřihovém místě za U6, čímž se tak vytvoří aktivní místo pro druhou transesterifikační reakci, která spojením exonů dokončí sestřihovou událost (Obr. 1; Valadkhan et al., 2003; Alberts et al., 2008).



Obrázek 1: Schéma první a druhé transesterifikační reakce během sestřihové události. **Růžově** jsou zobrazeny skupiny, které se účastní první reakce (první krok) a **modře** skupiny, účastníci se druhé reakce (druhý krok). **Zeleně** jsou označeny 5' (GU) a 3' (AG) konsensní sestřihová místa v intronu a adenosin v místě větvení. V prvním kroku hydroxylová skupina (2'-OH) adenosinu v místě větvení atakuje fosfodiesterovou vazbu v 5' exon-intronového spojení (5' sestřihové místo), což vede k přerušení fosfodiesterové vazby mezi 5' exonem a intronem a vytvořením nové 5'-2' fosfodiesterové vazby mezi 5' koncem intronu a adenosinem místa větvení za vzniku smyčky. Ve druhém kroku volná 3'-OH skupina 5' konce exonu atakuje fosfát ve spoji 3' konce intronu a 3' exonu (3' sestřihové místo) a dojde ke spojení exonů za uvolnění smyčky. Smyčka je později degradována. Obrázek převzat z Horowitz, 2012.

1.1.2 Alternativní RNA sestřih – funkce a význam

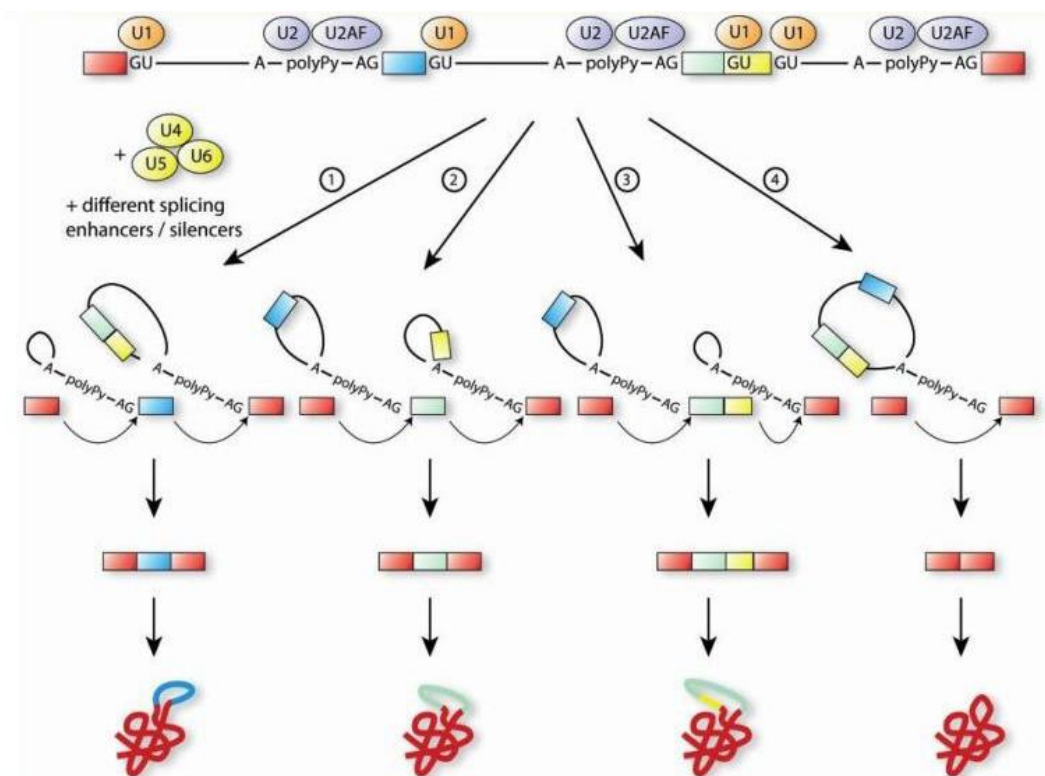
Konstitutivním sestřihem pre-mRNA (popsaným výše) vzniká divoká (wt) forma mRNA, ve které jsou zachovány všechny exony (došlo tedy k vyštěpení všech vmezeřených intronových sekvencí). Za určitých okolností však může dojít i k tzv. alternativnímu sestřihu (Obr. 2). Alternativní sestřih probíhá u většiny lidských genů a jeho podstatou je rozdílné rozpoznání jinak intaktních konsensních *cis*-regulačních sekvencí sestřihovým aparátem.¹

Po překvapivém zjištění, že lidský genom obsahuje poměrně málo genů kódujících proteiny (~ 30 tisíc), je tématu alternativního sestřihu věnována zvýšená pozornost. Předpokládá se, že využití alternativního sestřihu umožňuje vysokou variabilitu proteomu, kdy se z jednoho genu, respektive primárního transkriptu, může vytvářet řada mRNA translatovaných do mnoha izoform proteinů s různorodými vlastnostmi (Pollard a Earnshaw, 2008). Bylo zjištěno, že lidské geny, které obsahují více exonů, podstupují alternativní sestřih až v 95 % případů (Pan et al., 2008).

¹Vzhledem ke skutečnosti, že sestřih pre-mRNA je výsledkem interakce *cis*-regulačních motivů se sestřihovými faktory, změny v *cis*-regulačních sekvencích, vznikající jako mutace v genomové DNA, mohou vést k patologickým změnám sestřihu. V takovémto případě obvykle hovoříme o aberantním (nikoliv alternativním) sestřihu.

Alternativní sestřih může ovlivňovat finální proteinový produkt jak kvalitativně, tak kvantitativně. Mezi kvalitativní ovlivnění patří výpadek exonů či inserce alternativního exonu nebo vytvoření předčasného stop kodonu. Mezi kvantitativní ovlivnění patří změny v 5'- či 3'-UTR, které ovlivňují transport mRNA, stabilitu mRNA či sílu translace a další.

Translací alternativně sestřižených mRNA vznikají soubory proteinů obsahující různé kombinace funkčních domén (kódovaných různými exony) z jediné pre-mRNA (Obr. 2). Alternativní produkt se tak může od divokého (wt) produktu lišit strukturně, funkčně (enzymatickou nebo signální aktivitou), asociacemi s vazebnými partnery, intracelulární lokalizací nebo stabilitou.



Obrázek 2: Schéma alternativního sestřihu. Červenými obdélníky jsou znázorněny konstitutivní exonové sekvence. Modrými, zelenými a žlutými obdélníky jsou vyznačeny alternativní exony. Intronové sekvence s 5' sestřihovým místem (GU), místem větvení (A), polypyrimidinovým místem (polyPY) a 3' místem větvení (AG) jsou znázorněny černě. Sestřihové faktory U1 – U6 a U2AF jsou vyznačeny oranžovými, fialovými a žlutými elipsami. Šipkami s čísly 1-4 jsou znázorněny různé situace alternativního sestřihu, které vytvářejí různé produkty na základě tkáňové specifičnosti nebo různého působení pomocných regulačních sestřihových faktorů. Obrázek převzat z Wood et al., 2010.

1.1.2.1 Alternativní sestřih – regulace

Kromě základních sestřihových faktorů (skupina snRNP, kapitola 1.1.1) se na regulaci sestřihu podílejí i pomocné sestřihové faktory nezbytné jak pro konstitutivní sestřih, tak pro výběr sestřihových míst při alternativním sestřihu. První ze dvou tříd těchto faktorů jsou proteiny bohaté na serin a arginin (SR – serine-arginine rich) a jejich příbuzné proteiny SR-related proteins (Krecic a Swanson, 1999; Cowper et al., 2001). Druhou třídou jsou heterogenní nukleární ribonukleoproteiny (hnRNP; Fu, 1995). Obě třídy těchto pomocných faktorů se váží na *cis* elementy pre-mRNA jako pozitivní (enhancery) nebo negativní (silencery) regulátory konkrétního sestřihového místa lokalizovaného uvnitř exonů (ESE/ESS) či intronů (ISE/ISS). SR proteiny a jejich příbuzná skupina se váže na *cis* elementy, které zesilují sestřih mezi nejbližším 5' a 3' sestřihovým místem, zatímco hnRNP faktory se váží na tlumící sekvence u 3' místa, kde inhibují možnost sestřihu, nebo podporují použití vzdálenějšího 5' sestřihového místa (Shen a Green, 2004; Blencowe, 2000; Fairbrother a Chasin, 2000). Poměr jaderné koncentrace pozitivně působících SR proteinů a inhibičních hnRNP faktorů je proto jedním ze základních regulačních mechanismů alternativního sestřihu (Caceres et al., 1994).

Dalším z mechanismů, které ovlivňují alternativní sestřih, je fosforylace sestřihových faktorů, které jsou většinou fosfoproteiny. Míra jejich fosforylace je důležitým faktorem, který určuje jejich funkci a aktivitu. Fosforylace SR proteinů je nezbytná pro iniciaci sestavení sestřihového aparátu a i pro průběh sestřihu pre-mRNA uvnitř spliceosomu (Cao et al., 1997) a dále je důležitá pro stabilitu SR proteinů, které jsou v hyperfosforylovaném stavu degradovány v proteozomu (Lai et al., 2003). Sestřihové faktory rodiny hnRNP rychle cestují mezi jádrem a cytoplazmou a využívají přitom systému jaderných transportních receptorů a transportního proteinu – transportinu. Fosforylace hnRNP faktorů přímo ovlivňuje jejich vazebnou kapacitu na transportin a tím i import hnRNP do jádra (Allemand et al., 2005).

Dalším faktorem alternativního sestřihu je struktura chromatinu přepisovaného genu a rychlost elongace RNA polymerázy II (RNA Pol II). Rychlost RNA Pol II je ovlivněna její fosforylací na C-koncové doméně i fyzickou strukturou chromatinu v oblasti přepisovaného genu. Obecně je pomalejší elongace RNA Pol II spojena s vyšší pravděpodobností zařazení alternativního exonu do kódující sekvence mRNA. Uzavřenější struktura chromatinu či nízká míra fosforylace RNA Pol II tak může mít za následek tvorbu alternativního sestřihového produktu a následně alternativní proteinové izoformy (Shukla a Oberdoerffer 2012).

1.2 Lokalizace a struktura genu *BRCA1*

V roce 1994 bylo završeno několikaleté úsilí hledání predispozičního faktoru vzniku dědičné formy karcinomu prsu objevem a přesnou lokalizací genu *BRCA1* (Breast Cancer 1 Gene; OMIM 13705) na dlouhém raménku chromozomu 17 (17q21.31; Hall et al., 1990; Miki et al., 1994).

Gen *BRCA1* má velikost 81 188 bp a je tvořen 24 exony, z nichž dva jsou nekódující. Délky jednotlivých exonů jsou proměnlivé (Obr. 3; Miki et al., 1994; Smith et al., 1996)



Obrázek 3: Schéma poměrů délky jednotlivých kódujících exonů genu *BRCA1*. Největší exon (exon 10b – dle staré, a stále většinou používané nomenklatury exon 11) má velikost 3426 bp a zahrnuje tak více jak 60 % kódující sekvence. Naproti tomu nejmenší exon – exon 19 – obsahuje pouze 41 bp.

Neobvykle vysoký výskyt *Alu* repetice v intronech genu (41,5 %) a pseudogen *BRCA1Ψ*, ležící 44,5 kb před 5' začátkem genu *BRCA1*, se významně podílí na zvýšené pravděpodobnosti vzniku intragenových přestaveb *BRCA1*, které se v naší populaci vyskytují asi u 10 % nosičů mutací v tomto genu (Smith et al., 1996; Ticha et al., 2010).

1.2.1 *BRCA1* mRNA

Divoká forma mRNA genu *BRCA1* má velikost 7,8 kb a zprvu byla nalezena kromě mamární tkáně i ve tkáních varlete, brzlíku a ovarií. Později bylo prokázáno, že exprese *BRCA1* mRNA je polyubikvitní (Miki et al., 1994).

Kromě wt se v různých tkáních vyskytuje pravděpodobně i řada alternativních forem mRNA. Jejich identifikace je hlavní náplní této práce.

V roce 2001 Orban a Olah (2001) provedli expresní analýzu několika alternativních sestřihových variant (ASV) genu *BRCA1* na základě jejich dřívější identifikace (Lu et al., 1996). Jejich experiment se zabýval analýzou výskytu vybraných ASV *BRCA1*: *BRCA1* s alternativním krátkým exonem 10a, *BRCA1* Δ 8-9 s alternativním exonem 10a a *BRCA1* Δ 8-9 s konstitutivním exonem 10b v různých fázích buněčného cyklu. Výsledky prokázaly rozdílný expresní profil ASV *BRCA1* u buněčných linií karcinomu prsu a ovaria v porovnání

s buněčnými liniemi leukémie ve stejné buněčné fázi. Na základě těchto výsledků byla vyslovena odvážná hypotéza, že deregulace alternativního sestřihu mRNA BRCA1 může přispívat ke vzniku karcinomu prsu či ovaria i v případě nemutovaného genu *BRCA1*.

Následně byly identifikovány další alternativní sestřihové varianty BRCA1 s delecemi různých exonů (Tab. 1), a až na ojedinělé výjimky není překvapivě známa tkáňová specifita, dynamika změn či funkce alternativních sestřihových variant BRCA1.

Tabulka 1: Identifikované sestřihové varianty BRCA1. Upraveno dle Orban a Olah, 2003.

	Popis varianty (alternativní exon)	Tkáň, ve kterých byly nalezeny
Varianty zachovávající čtecí rámec	wt BRCA1	prs, ovarium, varle, brzlík
	- s exonem 1a	prs, ovarium, varle, brzlík
	- s exonem 1b	placenta
	$\Delta 2-9$	prs, lymfocyty
	$\Delta 4$	prs, ovarium, lymfocyty
	$\Delta 4-5$	prs, lymfocyty
	$\Delta 8-9$	prs, ovarium, lymfocyty
	BRCA1a (10a)	prs, ovarium, lymfocyty
	$\Delta 8-10$	prs, lymfocyty
	$\Delta 8-9$ (10a)	ovarium, štítná žláza
	$\Delta 14-17$	prs, lymfocyty
	$\Delta 14-18$	prs, lymfocyty
Varianty s posunem čtecího rámce	$\Delta 3$	prs, lymfocyty
	$\Delta 3-4$	lymfocyty
	$\Delta 4$	prs, ovarium, lymfocyty
	$\Delta 5-6$	lymfocyty
	$\Delta 9$	lymfocyty
	$\Delta 15-17$	prs, lymfocyty

Pozn.: 10a je zkrácená varianta exonu 10b o posledních 3309 b.

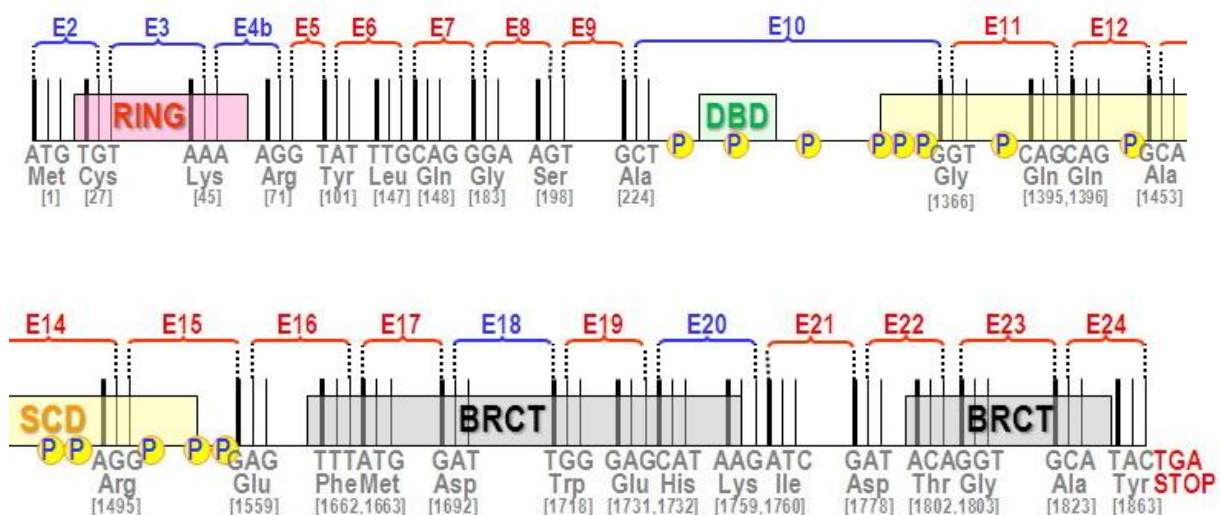
Varianta genu *BRCA1* s alternativním sestřihem způsobujícím výpadek 3309 bp v exonu 10 se označuje jako BRCA1a (10a) a varianta BRCA1 $\Delta 8-9$ (10a) jako BRCA1b (Wang et al., 1997). BRCA1a mRNA se od BRCA1 wt liší výpadkem většiny exonu 10 a kóduje protein o

velikosti 110 kD, který postrádá svou centrální část (AK 263 – 1365). BRCA1b navíc postrádá exony 8 a 9 (41 AK, taktéž v centrální oblasti proteinu) a má velikost 100 kD.

V roce 2004 byla identifikována alternativní sestřihová varianta genu *BRCA1* nazvaná BRCA1 IRIS (in-frame reading of BRCA1 intron 11 splice variant; ElShamy a Livingston, 2004). Tato varianta obsahuje unikátní promotor a alternativní exon 1c, který leží 24 Mb před vlastním genem *BRCA1* a je ukončena v exonu 10 inzercí 335 nukleotidů z intronu 10. Kódující sekvence mRNA BRCA1 IRIS obsahuje 4497 b a její translaci vzniká proteinový produkt o velikosti 150 kD. Na rozdíl od ostatních sestřihových variant BRCA1 vykazuje BRCA1 IRIS výrazně odlišný funkční profil.

1.3 Funkční domény proteinu BRCA1

Divoká forma proteinu BRCA1, vznikající translací konstitutivní formy mRNA s 22 kódujícími exony, má velikost 220 kD a skládá se z 1863 aminokyselin. Tento jaderný fosfoprotein obsahuje několik zásadních funkčních domén nezbytných pro jeho správnou funkci, z nichž nejvíce konzervativní RING finger doména a dvě tandemové BRCT domény leží na obou protilehlých koncích proteinu (Obr. 4).

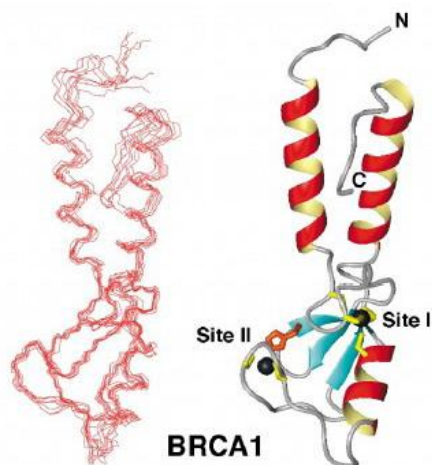


Obrázek 4: Schématické rozmístění funkčních domén wt formy proteinu BRCA1. **Růžově** je vyznačena N-koncová RING finger doména, **zeleně** DNA vazebná doména (DBD), **žlutě** doména bohatá na serinové zbytky (SCD) a **šedě** je vyznačen tandem C-koncových BRCT domén. **P** jsou vyznačena místa fosforylace proteinu (kapitola 1.3.4). **Modře** jsou vyznačeny názvy exonů, při jejichž výpadku je zachován čtecí rámec a **červeně** exony, při jejichž výpadku je čtecí rámec porušen. Obrázek je v exonu 14 rozdělen na dvě části. Upraveno dle Ševčík et al., 2012.

Jednotlivé funkční domény proteinu BRCA1 jsou kódovány různými exony. Jejich zahrnutí či vynechání ze sekvence v důsledku alternativního sestřihu pre-mRNA dává vzniknout BRCA1 variantám s různým funkčním významem. Podobně jako u jiných proteinů podstupující alternativní sestřih, lze předpokládat, že i v případě proteinu BRCA1 je výsledná funkce proteinu dána souhrnem aktivit různých exprimovaných alternativních sestřihových variant (Ševčík et al., 2012). Lze tak předpokládat, že i v případě BRCA1 se regulace alternativního sestřihu může podílet na regulaci funkce tohoto proteinu. Kromě experimentálních prací podporuje tento předpoklad i řada doposud identifikovaných aberantních sestřihových variant BRCA1 vznikajících na základě mutací v konsenzních sestřihových místech, které u nosičů mutací v těchto místech (podobně jako patogenní mutace v genu *BRCA1*) zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu a/nebo ovaria (Thomassen et al., 2012).

1.3.1 RING finger doména

V N-koncové oblasti proteinu BRCA1 (aminokyseliny 24 – 65; Obr. 4) se nachází RING (really interesting new gene) finger doména. Struktura této domény zahrnuje velmi konzervativní strukturní motiv stabilizovaný přítomností Zn^{2+} (Obr. 5). Přítomnost RING finger domény determinuje příslušnost BRCA1 do jedné ze skupin E3-ubikvitinligáz, enzymů schopných zprostředkovat kovalentní vazbu ubikvitinového zbytku na specificky rozeznávaný intracelulární protein (Miki et al., 1994; Lorick et al., 1999).



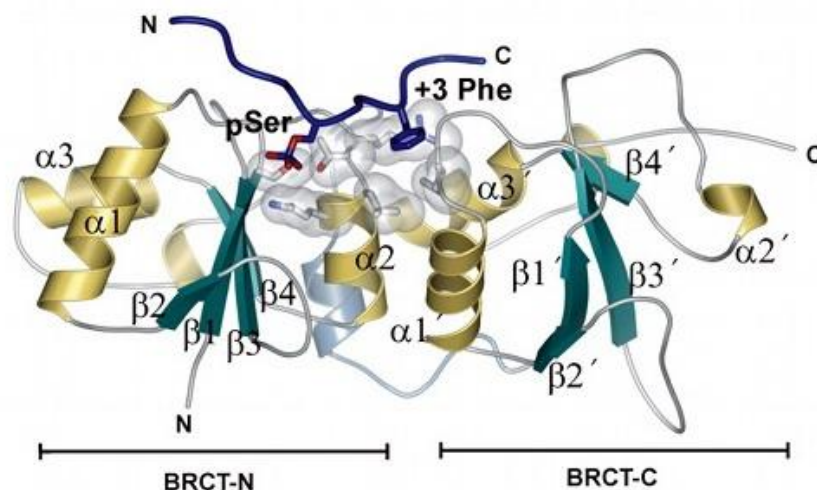
Obrázek 5: Diagram struktury RING finger domény proteinu BRCA1. Červeně jsou vyznačeny 3 α -helixy, zeleně 3 β -listy. Žlutě (Cys) a oranžově (His) jsou vyznačeny místa (Site I a II) pro vazbu kationtů Zn^{2+} (černě), stabilizujících strukturu RING finger domény. Obrázek převzat z Brzovic et al., 2001

Tato doména slouží rovněž jako protein-proteinový interakční modul s jinými proteiny obsahujícími RING finger doménu. Při vzniku takového komplexu je katalytická aktivita

vzniklého heterokomplexu E3-ubikvitinligáz významně zesílena (v řádech tisíců). Typickým vazebným partnerem BRCA1 v místě RING finger domény je protein BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein; Obr. 8; Wu et al., 1996; Morris a Solomon, 2004). Dalším z partnerů je BAP1 (BRCA1-associated protein 1), který o vazebné místo na RING finger doméně BRCA1 s BARD1 kompetuje. Na rozdíl od BARD1 nemá BAP1 funkční E3-ubikvitinligázovou doménu, ale je strukturně homologní k ubikvitinhydrolázám (Jensen et al., 1998). Doposud nebylo zjištěno, že by komplex s BAP1 vykazoval enzymatickou aktivitu, spíše jen předpokládáme, že jen kompetitivně inhibuje vznik BRCA1/BARD1 heterokomplexu.

1.3.2 BRCT (BRCA1 C-terminální) domény

Další významnou funkční strukturou proteinu BRCA1 je tandem repetitivních BRCT (BRCA1 C-terminus) domén lokalizovaných mezi aminokyselinami 1642 – 1736 a 1756 – 1855 (Obr. 4; Williams et al., 2001). Tyto konzervativní fosfoproteinové interakční moduly umožňují specifickou fosfoprotein-proteinovou interakci (Obr. 6) díky které se za účasti BRCA1 vytváří několik funkčně významných proteinových makrokomplexů (kapitola 1.4.1; Koonin et al., 1996; Bork et al., 1997).



Obrázek 6: Diagram struktury tandemu BRCT domén. Každá z domén obsahuje centrálně lokalizovaná jádra složená ze čtyř paralelně uspořádaných β -skládaných listů (**zelenomodře**) obklopeného třemi α -helixy (**žlutě**). Obě BRCT domény jsou spojeny pravděpodobně flexibilním linkerem (**světle modře**), který má důležitý podíl na stabilizaci celé struktury. **Tmavě modře** je vyznačen substrát s typickým pSxxF motivem, který BRCT domény specificky rozpoznávají. Obrázek převzat z Williams et al., 2004.

Protein BRCA1 tak specificky interaguje s proteiny, které jsou součástí komplexů podílejících se na reparaci DNA, jako jsou Abraxas (ABRA1), BACH1 (BRCA1-associated C-terminal helicase známý též jako BRIP1 – BRCA1 interacting protein 1), CtIP (C-terminal interacting protein) a dále s proteiny modulujícími strukturu chromatinu jako je histonacetyltransferázový CBP/p300 s transkripční aktivitou (CREB binding protein/p300) a histondeacetylázy 1 a 2 (HDAC1/2; Wang et al., 2007; Yu a Chen, 2004; Chai et al., 1999; Narod a Foulkes 2004). Pomocí BRCT domén BRCA1 často specificky interaguje s fosforylovanými proteiny, které jsou substráty kinázové aktivity ATM (Ataxia telangiectasia mutated) a ATR (Ataxia telangiectasia a RAD3-related) kináz. Tyto kinázy zprostředkovávají aktivaci signálních drah v odpovědi na poškození genomové DNA (Manke et al., 2003).

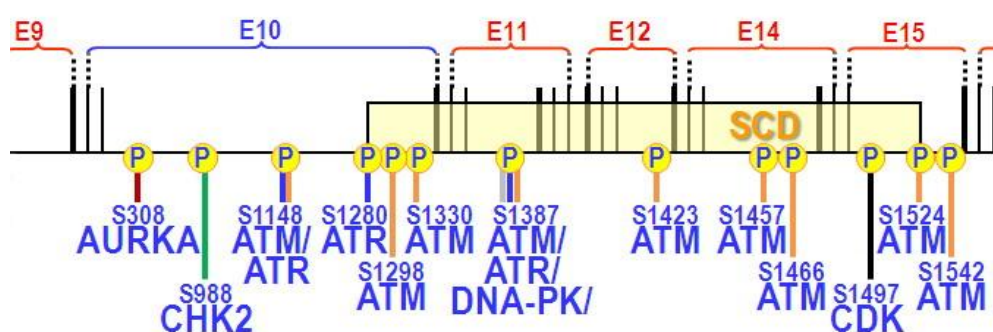
1.3.3 Sekvence pro jaderné lokalizační signály (NLS)

V exonu 10 BRCA1 byly, na základě *in silico* analýz, objeveny dvě sekvence které by mohly být zodpovědné za aktivní import proteinu do jádra. V experimentech s bodovými mutacemi alterujícími strukturu těchto oblastí byla potvrzena lokalizace a funkce nukleárních lokalizačních signálů BRCA1 nacházejících se mezi aminokyselinami 501 – 508 (NLS1) a 607 – 614 (NLS2; Thakur et al., 1997). Dále bylo prokázáno, že NLS 1 interaguje s importinem α - BRCA1, tedy využívá pro jadernou lokalizaci kanonickou α/β importinovou dráhu (Chen et al., 1996).

V roce 1997 byla v jádře lokalizována varianta BRCA1a s delecí exonu 10b (BRCA1 Δ 10b; kde jsou situovány oba NLS) a na základě toho byla diskutována možnost alternativní cesty vstupu BRCA1 do jádra (Wang et al., 1997). Později bylo zjištěno, že BRCA1a se lokalizuje do jádra v podobě heterodimerního komplexu s BARD1 za využití NLS BARD1. Tento heterodimer má jednak schopnost vázat importin α , navíc bylo ukázáno, že BARD1 při interakci kryje dva silné nukleární exportní signály (NES) BRCA1 lokalizované mezi aminokyselinami 22 – 30 a 81 – 99. Z těchto důvodů je interakce s BARD1 pro dostatečnou a stálou lokalizaci BRCA1 (i wt) v jádře zásadní (Fabbro et al., 2002; Rodríguez a Henderson, 2000; Thompson et al., 2005).

1.3.4 Doména obsahující serinové zbytky (Serine-containing domain; SCD)

Oblast bohatá na přítomnost serinových zbytků reprezentuje aktivační doménu proteinu BRCA1 nacházející se mezi aminokyselinami 1280 – 1524 (Obr. 4). Fosforylace serinových zbytků hojně zastoupených v této oblasti ovlivňuje konformaci BRCA1 proteinu a tím i konformaci BRCT domén, kdy mění jejich vazebnou afinitu k substrátům. Protein BRCA1 je dominantně fosforylován kinázami ATM a ATR v závislosti na typu poškození DNA a dále pak kinázami CDK2 (cyklin-dependentní kináza 2), DNA-PKcs (katalytická podjednotka DNA-dependentní protein kinázy), CHK2 (check point kináza 2), Akt1 (známá též jako proteinkináza B α) a AURKA (Aurora kinase A; Obr. 7).



Obrázek 7: Schéma míst fosforylací BRCA1. **Žlutě** je vyznačena SCD doména, **modře** a **červeně** rozsahy exonů *BRCA1*, **P** je vyznačeno místo fosforylace s modrým popiskem pozice a názvem kinázy. Upraveno ze Ševčík et al., 2012.

Serinové zbytky v SCD reprezentují pro každou kinázu jedinečná či společná fosforylační místa, která v závislosti na počtu či kombinaci fosforylací modulují vazebnou kapacitu BRCA1 s různými proteiny. V závislosti na typu fosforylace či kombinaci fosforylací vytváří BRCA1 rozdílné proteinové komplexy schopné různých odpovědí (Ouchi et al., 2006).

Studie Ševčík et al. (2012) zaměřená na funkční charakterizaci proteinové varianty BRCA1 Δ 14-15 (106 AK mezi aminokyselinami 1453 – 1559; delece posledních 71 aminokyselin v SCD doméně), dokazuje částečnou aberaci reparační kapacity BRCA1 této proteinové izoformy. Poškozená genomová DNA buněčné linie MCF7 se v případě dvouřetězcových zlomů pomaleji reparaovala. Výsledky této studie podtrhují důležitost fosforylací v SCD doméně v závislosti na funkci (interakční kapacitě BRCT domén) proteinu BRCA1.

1.3.5 DNA vazebná doména (DBD)

BRCA1 má schopnost, díky své DNA-vazebné doméně (v exonu 10 mezi aminokyselinami 452 – 1079; Obr. 4), nspecifické vazby s úseky DNA o délce alespoň 300 – 500 bází. K interakci s DNA dochází v případě dvouřetězcových zlomů (DSB – double strand breaks) nebo při kolapsu replikační vidlice, kdy se specificky do míst rozvětvení DNA naváže pravděpodobně velké množství molekul BRCA1. V místech vazby BRCA1 na DNA dochází k zabránění dalšímu jejímu poškození, dále pak k modulaci odpovědi na poškození DNA či k iniciaci oprav DNA (Paull et al., 2001).

1.3.6 Doména s funkcí aktivace transkripce

Jednou z prvních nalezených funkčních oblastí byla doména na C-konci proteinu, která obsahuje velkou acidickou doménu a u které byla na kvasinkovém a poté i na savčím modelu prokázána funkce aktivace transkripce. Dále se zjistilo, že BRCA1 dokáže *in vitro* vázat transkripční faktory TFII-F, -E a -H, které přímo asociují s holoenzymem RNA polymerázy II, a proto se předpokládá vliv BRCA1 na transkripci. (Miki et al., 1994, Monteiro et al., 1996; Scully et al., 1997a).

1.4 Funkce proteinu BRCA1

Dědičné mutace genu *BRCA1* jsou příčinným faktorem vzniku hereditární formy karcinomu prsu a ovaria. Hlavní funkcí tohoto tumor-supresorového proteinu je udržování stability genomové DNA, a to především opravami dvouřetězcových zlomů a dále pak opravami spojenými s rozpadem replikační vidlice. BRCA1 se dále podílí na regulaci buněčného cyklu, apoptózy a regulaci transkripce. Inaktivace BRCA1, ke které dochází v důsledku mutací, intragenových přestaveb či hypermetylací promotoru genu *BRCA1*, způsobuje selhání oprav DSB DNA, vedoucí ke vzniku genomové nestability a v konečném důsledku k nádorové transformaci v postižených buňkách. Příčina vzniku tkáňově specifických nádorů prsu a ovaria u nosičů patogenních alterací genu *BRCA1* je doposud neznámá.

Na myším modelu bylo prokázáno, že embrya *BRCA1*^{-/-} vykazují časnou letalitu s masivní indukci apoptózy, defekty ve vývoji mezodermy a snížený proliferací potenciál. To dokládá

nepostradatelnost proteinu BRCA1 při embryonálním vývoji a podtrhuje to tak jeho význam (Hakem et al., 1996).

Aktivity proteinu BRCA1 uplatňující se v řízení oprav dvouřetězcových zlomů genomové DNA a řízení odpovědi na genotoxické inzulty jsou realizovány na základě vzniku BRCA1 superkomplexů.

Rozdíl ve funkcích většiny ASV BRCA1 oproti divoké formě není objasněn. Výjimkou jsou varianty BRCA1a a 1b, které nevykazují zásadní poruchu funkce wt BRCA1 jako tumor-supresorů *in vitro* (Yuli et al., 2007). Dále bylo zjištěno, že obě izoformy mohou signifikantně inhibovat růst estrogení receptor exprimujících (ER-pozitivních) buněčných linií karcinomu prsu, nicméně přesný mechanismus účinku není znám.

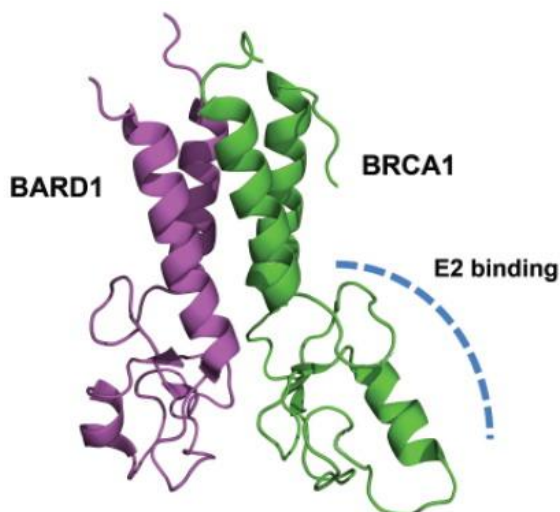
1.4.1 Tvorba BRCA1 superkomplexů

Protein BRCA1 je, kromě interakcí na RING finger doméně, součástí několika funkčně odlišných makrokomplexů, které se formují na základě interakce BRCT domén s řadou interakčních partnerů. BRCA1 tak vystupuje jako platformní a univerzální interakční partner proteinů, které mají vlastní enzymatickou úlohu v rámci oprav DNA. Úkolem proteinu BRCA1 je tedy časová a místní organizace interakčních partnerů v místě poškození DNA v podobě specifických makrokomplexů. BRCA1 vytváří různé komplexy v závislosti na signalizaci poškození DNA, čímž moduluje různé odpovědi v závislosti na druhu poškození DNA nebo v závislosti na fázi buněčného cyklu.

1.4.1.1 BRCA1/BARD1 „Core complex“ (CC)

Pro správnou funkci BRCA1 je nezbytná interakce s proteinem BARD1 zprostředkovaná RING finger doménami obou proteinů (Obr. 8) na jejímž základě se vytvoří vysoce stabilní heterodimer.

Jak již bylo uvedeno, interakce RING finger domén významně zvyšuje E3-ubikvitinligázovou aktivitu celého komplexu. Ta je podstatná pro lokalizaci BRCA1 v jádře (viz kapitola 1.3.3).



Obrázek 8: Diagram interakce proteinu BRCA1 s BARD1. Přerušovanou modrou křivkou je vyznačeno místo vazby E2-ubikvitinkonjugučního enzymu na BRCA1. Vysokou stabilitu asociace BRCA1/BARD1 zajišťuje uspořádání dvou α -helixů obou proteinů, které vytvářejí mohutný svazek čtyř α -helixů, který stabilizuje celou interakci. Obrázek převzat a upraven z Elia a Elledge, 2012.

E3-ubikvitinligázová aktivita komplexu má schopnost mono- či polyubikvitinylace specifických substrátů v reakci na poškození DNA. Ubikvitinylace proteinů, které se podílejí na reparačních pochodech DNA, jsou častým projevem jejich aktivace. V nedávné době byla na základě tohoto pozorování objevena existence ubikvitinyl-dependentní signální dráhy zapojené v odpovědi na poškození DNA (viz kapitola 1.4.1.2 *BRCA1A komplex*; Morris a Solomon, 2004; Kim et al., 2007).

Jedním ze substrátů ubikvitinylace je i přímý vazebný partner BRCA1 - CtIP (C-terminal interacting protein; shrnuto v (Dever et al., 2012)).

V *in vitro* experimentech bylo zjištěno, že komplex BRCA1/BARD1 monoubikvitinyluje histony včetně histonu H2AX, se kterým kolokalizuje do míst poškození DNA a přímo se podílí na remodelaci chromatinu, která umožňuje provést opravu poškozeného úseku DNA. Dále bylo zjištěno, že heterodimer BRCA1/BARD1 se autopolyubikvitinyluje na četných místech obou proteinů, a tím zvyšuje svou E3-ubikvitinligázovou aktivitu (Mallery et al., 2002).

Na rozdíl od wt formy BRCA1 se alternativní forma BRCA1 IRIS není schopná vazby s BARD1. Nadto postrádá obě BRCT domény (ElShamy a Livingston, 2004). BRCA1 IRIS se v buňce vyskytuje pouze asociovaná na chromatin do míst iniciace replikace DNA. Experimenty ukázaly nižší replikační aktivitu DNA při inhibici exprese BRCA1 IRIS a naopak zvýšení míry replikace při zvýšení exprese. Předpokládá, že BRCA1 IRIS svou asociací k chromatinu zastává důležitou funkci pozitivního regulátoru iniciace replikace DNA.

1.4.1.2 BRCA1 A komplex

Základem komplexu BRCA1 A je kromě heterodimeru BRCA1/BARD1, vytvořeném na N-konci BRCA1, asociace BRCA1 BRCT domén s adaptorovým proteinem Abraxas (ABRA1), se kterým asociuje několik dalších vazebných partnerů (Wang et al., 2007, Wang et al., 2009):

- RAP80 (receptor-associated protein, 80-kD)- protein obsahující tandem ubikvitin-vázajících motivů, které hrají roli ve specifickém rozpoznávání míst poškození DNA,
- BRCC36 (alias BRCC3 - BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 36) protein s deubikvitinylací aktivitou,
- BRCC45, jehož funkce v komplexu není ještě zcela objasněna a
- NBA1 (New component of the BRCA1 A komplex).

Tento komplex se specificky lokalizuje do míst poškození DNA způsobených ionizačním zářením, kde má schopnost vazby na polyubikvitinylované histony. Tato vazba je zprostředkována RAP80. Mechanismus specifické lokalizace celého komplexu není dosud zcela objasněn, ale NBA1 obsahuje WRN doménu, což je protein-protein interakční motiv, jenž by mohl být zodpovědný za vstup dalších proteinů do komplexu se schopností specifické lokalizace míst poškození DNA.

Hlavní funkcí komplexu je zřejmě přemístění heterodimeru BRCA1/BARD1 a proteinu BRCC36 do míst dvouřetězcových zlomů DNA, kde tyto proteiny na základě specifické ubikvitinylace/deubikvitinylace svých substrátů regulují proces homologní rekombinace (HR; Wang et al., 2009; shrnuto v (Dever et al., 2012)).

1.4.1.3 BRCA1 B komplex

V roce 2001 publikoval Cantor et al. (2001) práci, ve které prokázal přímou interakci proteinu BRCA1 s helikázou BACH1 (známou též jako BRIP1) během S-fáze buněčného cyklu (viz kapitola 1.3.2 *BRCT (BRCA1 C-terminální) domény*). Následně byla v roce 2006 zjištěna přímá interakce heterokomplexu BRCA1/BACH1 s TOPBP1 (Topoisomerase II-binding protein 1), který se přímo účastní replikace DNA a jejího kontrolního bodu v S-fázi buněčného cyklu. Komplex těchto proteinů byl později nazván BRCA1 B komplexem.

Interakce BACH1 s TOPBP1 je nezbytná pro zajištění správné funkce proteinu RPA (Replication protein A), který se během replikace dočasně na chromatin váže a chrání tak

jednořetězcovou DNA opožďujícího se řetězce. Vše nasvědčuje faktu, že BRCA1 B komplex se svými interakcemi účastní přímé kontroly správného průběhem replikace a detekce poškozené DNA. Tímto se BRCA1 v průběhu S-fáze buněčného cyklu podílí na zachování integrity genomu a v případě selhání replikace či zhroucení replikační vidličky moduluje opravy poškozené DNA (shrnuto v (Huen et al., 2010).

1.4.1.4 BRCA1 C komplex

Komplex BRCA1 C je složen z CtIP (C-terminal interacting protein; interagujícího s BRCA1 prostřednictvím BRCT domény) a MRN komplexu (MRE11/RAD50/NBS1) se kterým BRCA1 interaguje prostřednictvím RAD50. Komplex se podílí na opravě DSB homologní rekombinací, kde je zodpovědný za 5'→3' resekci DNA a vznik jednořetězcových 3' přesahů nezbytných pro další procesy HR.

V tomto komplexu je protein BRCA1 zodpovědný za propojení MRN komplexu s CtIP. CtIP zvyšuje aktivitu exonukleázy MRE11 a tím moduluje správný průběh homologní rekombinace (shrnuto v (Huen et al., 2009).

1.4.1.5 BRCC komplex

BRCA1 přímo interaguje s proteiny RAD51 a PALB2 (Partner and localizer of BRCA2), se kterými asociuje protein BRCA2. Vzniklý komplex se nazývá BRCC a má nenahraditelnou funkci při HR. BRCA2/PALB2 přivádí do míst poškození rekombinázový protein RAD51, jenž se váže na jednořetězcové přesahy a následně je zodpovědný za vyhledávání homologních sekvencí na sesterské chromatidě, které jsou nezbytné jako templát pro dosyntetizování poškozeného vlákna DNA.

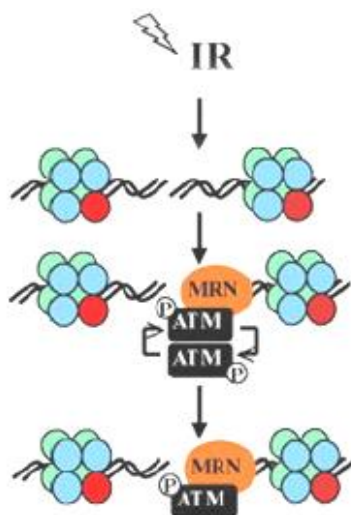
BRCA1 interaguje s RAD51 a zároveň s PALB2 prostřednictvím tzv. coiled-coil motivu (části polypeptidového řetězce BRCA1 lokalizovaného v oblasti aminokyseliny 1410). Na základě této interakce dochází ke ko-aktivaci RAD51. Následně se RAD51 vyváže z komplexu s BRCA2/PALB2 a zapojí se do procesu HR (Wong et al., 1997; Scully et al., 1997b).

1.4.2 Úloha BRCA1 v zachování genomové integrity

Protein BRCA1 se účastní několika specializovaných procesů oprav dvouřetězcových zlomů genomové DNA (homologní rekombinace a non-homologous end-joining; NHEJ) jako součást několika funkčních makrokomplexů (viz kapitola 1.4.1 *Tvorba BRCA1 superkomplexů*). Tyto makrokomplexy se tvoří na základě aktivace (fosforylace/ubikvitinylace) BRCA1 v závislosti na detekci poškození DNA.

1.4.2.1 Signalizace poškození genomové DNA ATM a ATR kinázou

Po detekci poškození DNA se spouštějí specifické signální kaskády, které zajišťují aktivaci efektorových proteinů reparace DNA a zároveň aktivaci signálů sloužících pro integraci DNA-reparačních pochodů do dalších signálních drah ovlivňujících např. průběh buněčného cyklu či aktivaci apoptózy. V závislosti na typu poškození se aktivují různé signální dráhy. ATM a ATR jsou serin-treoninové kinázy patřící do skupiny fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K)-related proteinů. Tato rozsáhlá skupina proteinů se účastní intracelulární signalizace v celé řadě signálních drah. ATM-dependentní signální dráha (do které patří i nepřímá aktivace ATR-dependentní dráhy) se aktivuje při detekci vzniku dvouřetězcových zlomů DNA, které vznikají exogenními faktory (ionizačním zářením) nebo na základě endogenních procesů (poruchy replikace DNA). V případě poškození genomové DNA a vzniku dvouřetězcového zlomu se do míst poškození DNA bezprostředně váže MRN (MRE11/RAD50/NBS1; Obr. 9; Lee a Paul, 2005).



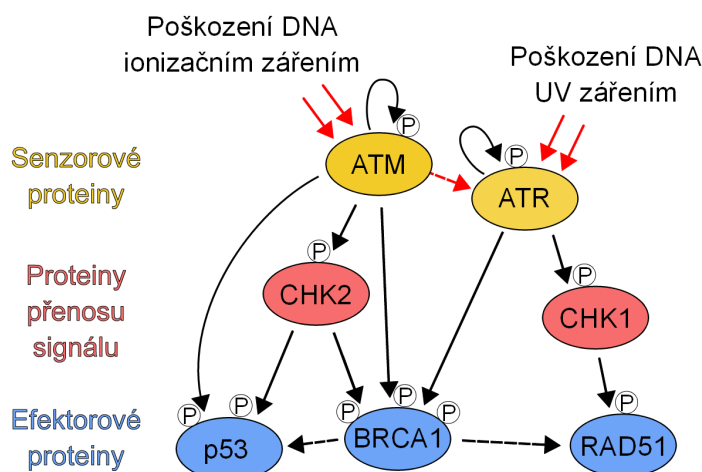
Obrázek 9: Schéma vzájemné autokatalytické aktivace ATM kináz po navázání na sensorový M/R/N komplex v místě poškození DNA účinkem ionizačního záření. K vzájemné fosforylaci ATM dojde změnou konformace obou podjednotek po navázání na MRN komplex. Po aktivaci ATM fosforyluje řadu substrátů (viz Tab. 1). Oranžově je vyznačen M/R/N komplex, černě ATM kinázy, zeleně, modře a červeně histony. Obrázek převzat a upraven dle Harper a Elledge, 2007.

Aktivované monomery ATM následně fosforylují několik cílových proteinů (viz tab. 2; shrnuto v (Ciccia a Elledge, 2010)). Tyto efektorové proteiny iniciují opravu poškozené DNA a zprostředkovávají (po)zastavení buněčného cyklu, případně aktivaci apoptózy.

Tabulka 2: Hlavní proteiny regulované aktivovanou ATM kinázou v iniciaci odpovědi na poškození genomové DNA.

Protein	Jeho funkce
CHK2	přenos, zesílení signálu z ATM na p53 a BRCA1, zástava buněčného cyklu inhibicí fosfatáz aktivujících cyklin-CDK komplexy (např. CDC25C)
p53	inhibice buněčného cyklu na základě p53-indukované exprese inhibitorů (např. p21 ^{waf1/cip1}), aktivace apoptózy (zvýšení exprese Bax)
BRCA1	asociace s p53, RAD51 a dalšími, což má za následek inhibici buněčného cyklu a iniciaci opravy poškozené DNA
H2AX	ovlivnění remodelace chromatinu, po jeho fosforylaci signalizuje místo zlomu DNA
MDC1	signalizace DNA poškození v místě fosforylovaného H2AX (γ H2AX), vazba na MRN komplex a následná iniciace polyubikvitinylace histonů, což má za následek translokaci reparačních proteinů do míst zlomu a tvorbu reparačního ohniska
NBS1	podílí se na signalizaci poškození DNA, aktivaci ATM a iniciaci kontrolního bodu buněčného růstu

ATM aktivuje protein BRCA1 (Obr. 10) fosforylací v oblasti SCD (Obr. 7; kapitola 1.3.4 *Doména obsahující serinové zbytky*). BRCA1 je dále fosforylována aktivovanou kinázou CHK2 (známá též jako hCDS1 – homolog of CDS1) a ATR. Tyto kinázy se tak podílí na zesilování signálu iniciovaného kinázou ATM a modulují tak správnou funkci BRCA1 (Obr. 10; Lee et al., 2000; Gatei et al., 2001).



Obrázek 10: Schéma aktivace signálních kaskád ATM a ATR kinázy. **Plné černé šipky** značí fosforylaci substrátu, **přerušovaná červená šipka** značí nepřímou aktivaci a **přerušované černé šipky** značí koaktivaci vazbou na substrát.

ATR se aktivuje v komplexu s ATRIP (ATR-interacting protein) po nasednutí na jednořetězcovou DNA krytou RPA (Replikační protein A) a iniciuje vlastní signální kaskádu, která aktivuje protein CHK1 – CHK1 fosforyluje RAD51, který je zásadní pro opravu DNA homologní rekombinací, CHK1 dále svou aktivitou iniciuje zastavení buněčného cyklu.

1.4.2.2 Úloha BRCA1 v opravě DNA homologní rekombinací

Jedním z nejvíce mutagenních buněčných poškození genomové DNA jsou dvouřetězcové zlomy (DSB). Jediný dvouřetězcový zlom může v proliferující buňce potencionálně vést ke ztrátě mnoha miliónů bází a tak naprosto zásadně ovlivnit její genomovou integritu. Na druhé straně evoluční vývojové procesy využívají dvouřetězcových zlomů jako nástroje ke zvýšení variability genomu. Příkladem jsou homologní rekombinace chromozomů během meiózy nebo programované zlomy V-D-J rekombinace (shrnutí v (Helleday et al., 2007))

Oprava DSB homologní rekombinací (HR) je možná v S a G2 fázích buněčného cyklu, kdy je zdvojená genetická informace. Jedná se o vysoce přesný proces opravy, kdy se poškozený úsek DNA rekonstruuje podle vzoru ze sesterské chromatidy. Z vysoké citlivosti buněk bez funkčního genu *BRCA1* na radiační záření, které způsobuje dvouřetězcové zlomy, můžeme vyvodit nepostradatelnost proteinu BRCA1 v průběhu jejich oprav (shrnutí v (Karran, 2000)).

Třebaže přesná posloupnost událostí procesu oprav DSB pomocí HR není plně objasněna, s jistotou můžeme říct, že BRCA1 se procesu účastní na několika úrovních v závislosti na vzniku BRCA1 superkomplexů.

V případě oprav HR se na místo DSB nejprve váže MRN komplex a ATM kináza iniciující signální kaskádu, na základě které se BRCA1 lokalizuje do místa poškození zřejmě jako součást BRCA1 A komplexu.

BRCA1 C komplex s navázaným CtIP se váže na MRN komplex, a díky této interakci se podpoří exonukleázová aktivita MRE11 tvořící 5'→3' jednořetězcové přesahy následně rozšířené působením helikázy BLM s exonukleázou EXO1 a stabilizované proteiny RPA. Na RPA proteiny se váže komplex ATR s ATRIP (ATR interakční protein). ATR aktivuje fosforylací CHK1 a ten fosforylací aktivuje RAD51 v komplexu BRCC (viz kapitola 1.4.1.5 *BRCC komplex*). BRCC komplex s aktivovaným proteinem BRCA1 a aktivovaným RAD51 se rozpadá, uvolněný RAD51 nasedá na jednořetězcové přesahy a (díky nukleoproteinovým

filamentům, která formuje) umožňuje vyhledání homologní sekvence na sesterské chromatidě. Po lokalizování správného úseku slouží sesterská chromatida jako templát pro syntézu poškozeného úseku genomové DNA (shrnutí v (Helleday et al., 2007)).

Protein BRCA1 v tomto komplexním procesu zastává úlohu interakčního partnera různých proteinů zodpovědných za aktivity během HR. Interakční kapacita proteinu BRCA1 se během opravy HR dynamicky mění, což přispívá k vytváření různých komplexů v závislosti na místě a čase a tak k správnému průběhu oprav DSB.

1.4.2.3 Úloha BRCA1 v opravě DNA pomocí NHEJ

NHEJ (Non-homologous end-joining) je dalším mechanismem opravy dvouřetězcových zlomů genomové DNA. Zatímco HR je přesný proces opravy integrity i sekvence DNA, tak oprava NHEJ udržuje pouze molekulární integritu DNA spojením sousedících přerušovaných úseků polynukleotidu. Vzhledem k mechanismu vzniku dvouřetězcových zlomů v DNA, kdy DSB s dislokací přerušovaných konců DNA se vyskytují především v průběhu S-fáze buněčného cyklu, není překvapivá vyšší míra oprav DSB cestou NHEJ než HR u vyšších eukaryot. Třebaže přesnost NHEJ je řádově nižší, než je tomu u HR, pro ligaci volných (a obvykle netranslokovaných konců DNA) je ve většině případů reparace pomocí NHEJ zcela vyhovující. Proces oprav HR se v buňce vyskytuje jen v pozdní S a G2 fázi buněčného cyklu, a i zde je u vyšších eukaryot oproti NHEJ minoritní. Reparace pomocí NHEJ probíhá ve všech fázích buněčného cyklu (Rothkamm et al., 2003). Regulační mechanismy výběru typu oprav DSB nejsou doposud zcela jasné, ale zdá se, že iniciace opravy HR je u vyšších eukaryot energeticky mnohem náročnější a komplexnější proces, než evolučně mladší a jednodušší oprava NHEJ. Na základě toho můžeme předpokládat, že i přes potenciální tvorbu chyb v sekvenci DNA je pro buňku vyšších eukaryot oprava metodou NHEJ ve většině případů výhodnější (shrnutí v (Mladenov a Iliakis 2011)).

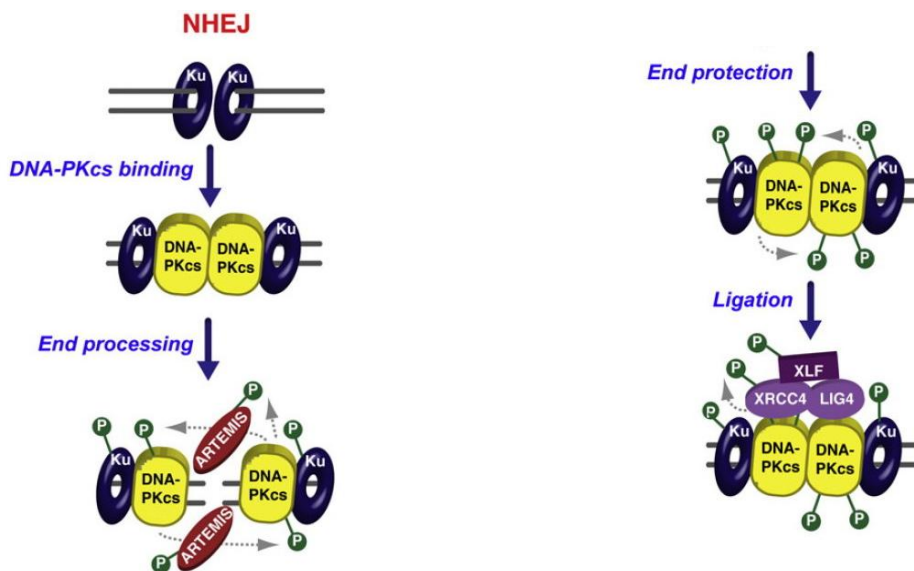
V nedávné době byly charakterizovány různé formy oprav DNA pomocí NHEJ, jako je alt-NEHJ/B-NHEJ – (alternative/backup-NHEJ; záložní NHEJ), který chybí více než konzervativní NHEJ (C-NHEJ – canonic/conservative označovaný též jako D-NHEJ – DNA-PK-dependentní-NHEJ). Alternativní NHEJ je minoritní cestou reparace DNA a je aktivován pouze v případě nefunkčnosti konzervativního NHEJ nebo na základě dosud ne zcela objasněných buněčných regulací (shrnutí v (Mladenov a Iliakis 2011)). Předpokládá se, že

přítomnost a funkční kapacita BRCA1 může ovlivňovat výběr reparace DNA cestou buď C-NHEJ a nebo B-NHEJ (shrnuto v (Yang a Xia, 2010)).

1.4.2.3.1 Konzervativní NHEJ

Konzervativní (kanonická nebo také DNA-PK-dependentní) NHEJ je univerzální opravný mechanismus DSB. Jeho princip je založen na jednoduché ligaci dvou konců dvouřetězcového vlákna DNA (Obr. 11).

Do místa zlomu se váže s velmi vysokou afinitou heterodimerní Ku70/80, který se v jádře vyskytuje ve vysokých koncentracích (až 300 000 molekul; shrnuto v (Lieber, 2010)). Na navázané proteiny Ku70/80 se specificky váže DNA-PKcs (katalytická podjednotky DNA-dependentní protein kinázy), která se po navázání aktivuje autofosforylací. Aktivovaná DNA-PKcs fosforyluje řadu substrátů účastnících se oprav: (LigIV – DNA Ligase 4, XRCC4 a další). DNA-PKcs také váže endonukleázu Artemis, která odstraní případné jednořetězcové přesahy DNA bránící ligaci. Komplex proteinů LigIV, XRCC4 a XLF nakonec spojí oba konce DNA ligací a proces opravy je tímto ukončen (shrnuto v (Lieber, 2010)).

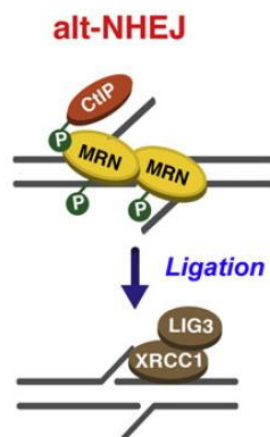


Obrázek 11: Schéma opravy DNA konzervativní NHEJ. Na levé straně obrázku vidíme v prvním kroku vazbu Ku70/80 do míst dvouřetězcového zlomu. Ve druhém kroku (DNA-PKcs binding) se na heterokomplex proteinů Ku váže katalytická podjednotka DNA-PK. Ve třetím kroku (End processing) po fosforylování substrátů DNA-PKcs endonukleáza Artemis odstraňuje případné jednořetězcové přesahy. Ve čtvrtém kroku (End protection) se na sebe vážou obě DNA-PKcs a oba rozštěpené konce dvoušroubovice se tak přibližují, aby byly v pátém kroku (Ligation) ligovány. Obrázek převzat a upraven dle Ciccia a Elledge, 2010.

U DSB zlomů s jednořetězcovými přesahy jsou tyto přesahy odstraněny při obnově integrity DNA endonukleázovou aktivitou Artemis čímž vzniká DNA s delecí několika nukleotidů. U DSB s tupými konci nezpůsobuje oprava pomocí C-NHEJ vznik chyby v sekvenci DNA. Negativním aspektem oprav NHEJ je možnost spojení dvou jinak nesousedících konců DNA dvoušroubovice. Tato možnost je ale minimalizována velikostí komplexu Ku70/80, který zabraňuje pohybům konců vzniklých DSB (shrnuto v (Mladenov a Iliakis, 2011))

1.4.2.3.2 Alternativní NHEJ

Minoritní reparační mechanismus - alternativní NHEJ (alt-NHEJ nebo také B-NHEJ – backup-NHEJ; záložní NHEJ) je aktivován pouze v případě absence některého z důležitých proteinových komponent C-NHEJ. Tento mechanismus využívá proteinu PARP1 (Poly (ADP-ribose) polymerase 1) a MRN komplexu k rozpoznání místa zlomu. MRN komplex s navázaným CtIP (bez interakce s BRCA1) vytváří pouze omezené 5'→3' resekce DNA za vytvoření mikrohomologií mezi 5' koncem zkráceného antiparalelního vlákna z jedné strany zlomu a 5' koncem zkráceného paralelního vlákna z druhé (Obr. 12). Takto stabilizovaná DNA je nezbytná pro ligační reakci katalyzovanou Ligázou III (LigIII) v komplexu s XRCC1. Vlákna DNA spojí za odštěpení přesahujících částí 3' vláken.



Obrázek 12: Schéma alternativní NHEJ. V případě opravy dvouřetězcových zlomů DNA tímto mechanismem se do místa poškození váže MRN komplex a protein CtIP. Tento makrokomplex vytvoří částečné přesahy jednoho vlákna DNA za vzniku mikrohomologií. V následném kroku (Ligation) jsou vzniklé přesahy degradovány a DNA je ligována. Obrázek převzat a upraven dle Ciccia a Elledge, 2010.

Tento proces vytváří díky 5'→3' resekčním vždy chyby v sekvenci genomové DNA a je mnohem náchylnější k tvorbě chyb spojením různých konců DNA (shrnuto v (Mladenov a Iliakis 2011)).

Vliv proteinu BRCA1 na konzervativní a alternativní NHEJ není dosud zcela objasněn, ale experimenty na buňkách s inaktivovanou HR a mutovaným proteinem BRCA1 (neschopnost lokalizace proteinu BRCA1 v jádře) prokázaly inaktivaci konzervativní NHEJ a aktivaci alternativní, chybové, NHEJ. Tento fakt poukazuje na nezbytnost BRCA1 pro proces opravy DSB konzervativní NHEJ a udržování genomové integrity (shrnutí v (Yang a Xia, 2010)). Poruchy indukce konzervativního NHEJ byly nalezeny v buňkách modelové linie MCF-7 exprimující alternativní sestřihovou variantu BRCA1 Δ 14-15 (Ševčík et al., 2012).

2 CÍLE PRÁCE

Kromě hlavního transkriptu BRCA1 mRNA kódujícího wt protein o délce 1861 AK vzniká z BRCA1 pre-mRNA řada dalších alternativních sestřihových variant. Třebaže některé ASV BRCA1 vznikající na základě alternativního sestřihu intaktní pre-mRNA (bez přítomnosti genových alterací) byly popsány v literatuře, jejich systematická katalogizace chybí. Rovněž není doposud známa tkáňově specifická exprese ASV BRCA1 ani jejich exprese u nemocných s karcinomem prsu. Neznámou jsou rovněž kvantitativní poměry exprese jednotlivých ASV a jejich dynamika.

Náplní diplomové práce bylo především navržení a optimalizace systému pro identifikace sestřihových variant BRCA1 pre-mRNA, který bude sloužit pro systematickou katalogizaci ASV BRCA1 v různých lidských tkáních.

Cíle práce:

Diplomová práce je zaměřena na analýzu sestřihového vzorce BRCA1 mRNA s cílem:

1. Ustanovit robustní systém pro detekci, charakterizaci a kvantifikaci ASV BRCA1
2. Identifikovat alternativní sestřihové varianty BRCA1 v periferní krvi zdravých kontrol (žen podstupující redukční/korektivní mamoplastiku) a pacientek s karcinomem prsu
3. Kvantifikovat vybrané identifikované endogenní alternativní sestřihové varianty BRCA1 mRNA ve vyšetřovaných souborech

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Strategie řešení

K problematice identifikací ASV přítomných ve fyziologických humánních tkáních a následné kvantifikaci míry exprese vybraných variant byl zvolen následující přístup:

1. optimalizace systému pro identifikaci přítomných alternativních sestřihových variant na pracovní RNA izolované z buněčné linie MCF-7
2. identifikace ASV v RNA získané z humánních leukocytů izolovaných z periferní žilní krve u 58 žen zařazených do této studie (30 žen s karcinomem prsu v anamnéze a 28 zdravých žen podstupujících redukční mamoplastiku s negativní onkologickou rodinnou anamnézou tvořícího kontrolní soubor)
3. zhodnocení míry exprese vybraných ASV genu *BRCA1* v RNA získané z leukocytů izolovaných z periferní žilní krve u všech žen zařazených do studie a charakterizace genové exprese těchto ASV navíc v peroperačně bioptované mamární a přilehlé tukové tkáni u podskupiny 19 žen (9 s karcinomem prsu a 10 kontrol).

3.2 Genetický materiál

Pro optimalizaci metod byla použita celková RNA z buněčné linie MCF-7 stabilně kultivované v naší laboratoři. Identifikace ASV *BRCA1* ve tkáních probíhala s využitím biologického materiálu získaného v rámci operací prsu. Biologické vzorky byly odebrány a skladovány v RNA-prezervačních médiích.

3.2.1 Charakteristika buněčné linie MCF-7

Adherentní, stabilní buněčná linie MCF-7 je odvozena z nádorových buněk získaných z pleurálního výpotku pacientky s duktálním karcinomem prsu s fenotypem luminálních mamárních epitelí (mcf7.com). Tato linie obsahuje wt formu genu *BRCA1* a jeho plně funkční proteinové produkty.

3.2.2 Biologické vzorky od pacientek s karcinomem prsu a kontrol

Do studie bylo zařazeno celkem 58 žen, z nichž 30 žen podstupovalo chirurgický zákrok pro karcinom prsu (průměrný věk 49,9 roku; rozmezí 32 – 75 let věku). 28 žen s negativní osobní a nevýznamnou rodinnou onkologickou anamnézou podstupujících redukční mammoplastiku (průměrný věk 41,8 roku; rozmezí 18 - 65 let věku) tvořilo kontrolní soubor.

Podsoubor pro hodnocení míry exprese vybraných ASV všech dostupných biologických tkání tvořilo 19 žen – 9 pacientek s karcinomem prsu (průměrný věk 48,1 roku; rozmezí 33 – 75 let věku) a 10 kontrol (průměrný věk 48,6 roku; rozmezí 22 – 62 let věku).

Odběr biologického materiálu byl prováděn na Gynekologicko-porodnické klinice 1. LF UK a VFN a na Klinice plastické chirurgie 1. LF UK a FNB od pacientek, které vyjádřily souhlas se zařazením do studie podpisem informovaného souhlasu schváleného etickou komisí 1. LF UK a VFN.

Od jednotlivých probandek byl peroperačně odebrán vzorek periferní krve pro izolaci RNA a dále vzorky mamární a přilehlé tukové tkáně. Žilní krev byla odebrána do zkumavek PAXGene Blood RNA System (PreAnalytiX) a vzorky tkání byly neprodleně (do 5 minut) vloženy do zkumavek s roztokem RNAlater (Invitrogen). Vzorky krve odebrané do PAXGene byly skladovány 2 hod při pokojové teplotě a následně uskladněny při -20 °C do izolace RNA. Zkumavky se vzorky tkání (<100 mg tkáně v 1 ml RNAlateru) byly po 24 h inkubaci při teplotě 4 °C skladovány v -20 °C do izolace RNA.

3.3 Izolace a kvantifikace celkové RNA, příprava cDNA

3.3.1 Izolace celkové RNA z tkáňových vzorků

Celková RNA z periferní žilní krve (2,5 ml) byla izolována kitem PAXGene Blood RNA Kit (PreAnalytiX) dle originálního protokolu a byla eluována do 100 µl sterilní ddH₂O bez přítomnosti RNáz.

Tkáňové vzorky byly po rozmrazení nejprve nastříhány na drobné kousky sterilními nástroji a vloženy do zkumavek obsahující fragmentační kuličky (MagNA Lyser Green Beads; Roche) a 1 ml roztoku QIAzol Lysis Reagent (Qiagen). Homogenizace tkání probíhala po dobu 15 s, s opakováním (3 x) na přístroji MagNA Lyser Instrument (Roche) dle protokolu výrobce. Mezi jednotlivými homogenizacemi byly vzorky inkubovány 1 min na ledu. Vzorek byl

následně centrifugován a homogenát byl odebrán do nové zkumavky. Po 5 minutách inkubace při pokojové teplotě bylo k vzorku přidáno 200 μ l chloroformu, zkumavka byla protřepána a centrifugována 15 min, při 12000 rpm a teplotě -2 °C. Poté byla odebrána horní (vodná) fáze (cca 700 μ l), ke které byl přidán stejný objem 70% etanolu. Roztok byl 15 s třepán na vortexu a následně byl dále zpracován kitem RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen) dle přiloženého protokolu (Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues) od kroku číslo 7. RNA byla eluována do 40 μ l sterilní ddH₂O bez přítomnosti RNáz.

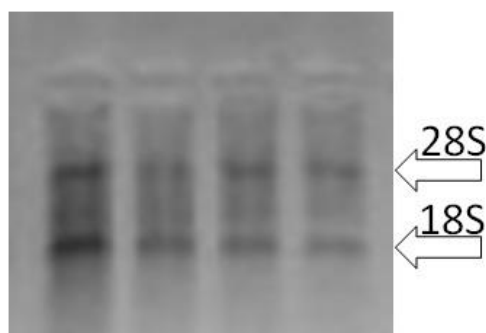
3.3.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace RNA

Množství izolované celkové RNA bylo kvantifikováno spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Vzorky RNA byly skladovány při -80 °C.

3.3.3 Měření kvality izolované RNA

Nedegradovaná RNA je jedním z nejdůležitějších faktorů nezbytných pro syntézu kvalitní cDNA a následné analýzy (Fleige et al., 2006). Integrita izolované RNA je charakterizována vysokým poměrem 18S a 28S ribozomálních podjednotek RNA vůči ostatním RNA.

Pro potřeby optimalizačních postupů byla kvalita celkové RNA orientačně ověřena elektroforézou na agarózovém gelu. 2 μ l izolované RNA byly smíchány se 4 μ l RNA vkladacího pufru a 10 min denaturovány při 65°C, poté inkubovány na ledu a naneseny na 1,5% agarózový gel v 1 x TAE obsahující ethidiumbromid. V případě nepoškozené celkové RNA byly na UV transluminátoru jasně zřetelné dva ostré proužky odpovídající 28S a 18S rRNA (Obr. 13).



Obrázek 13:
Příklad gelové elektroforézy celkové RNA izolované z periferní krve.

Integrita všech izolovaných celkových RNA byla z důvodu provedení expresních analýz charakterizována kapilární gelovou elektroforézou na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) za použití kitu Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) dle protokolu výrobce. Výsledkem analýzy byla charakterizace vzorku celkové RNA číslem RIN (RNA integrity number) v rozmezí 0-10, kde 10 značí celkovou RNA nejvyšší kvality. Toto číslo je vygenerováno na základě algoritmů porovnávající množství 18S a 28S rRNA oproti celkovému množství veškeré RNA. Pro expresní analýzy byly vybrány vzorky s RIN vyšším než 6 pro RNA z krve a vyšším než 5,5 pro RNA izolované ze tkání.

3.3.4 Syntéza cDNA (reverzní transkripce)

Syntéze cDNA u vzorků z buněčné linie MCF-7 a tkáňových vzorků předcházelo odstranění kontaminace DNA 30 min inkubací DNázou I (1 U/10 μ l RNA; Fermentas) při 37 °C. Inaktivace DNázy byla provedena 10 minutovou inkubací při 65 °C za přítomnosti 5 mM EDTA. RNA izolovaná ze vzorků krve byla ošetřena DNázou v průběhu izolace.

cDNA používaná k identifikaci ASV ve vzorcích RNA z periferní krve byla připravena s reverzní transkriptázou (rekombinantní virová RNA-dependentní DNA polymeráza) SuperScript III (SuperScript III First-Strand Synthesis System a oligo-dT primer; Invitrogen) dle následujícího protokolu:

Reagencie	Objem [μ l]
1 μ g RNA ošetřené DNázou (+ ddH ₂ O, bez RNáz)	12,2
oligo-dT primer	1,0
dNTPs (12,5 mM)	0,8
65°C (10 min); na led.	
DTT	1,0
5x pufr	4,0
SSIII	1,0
50°C (60 min); 70°C (15 min); na led (∞)	

Pro potřeby kvantitativní RT-PCR v reálném čase (qPCR) bylo z 2 μ g RNA připraveno 40 μ l cDNA se SuperScript III. Na rozdíl od syntézy cDNA pro účely identifikace ASV BRCA1 byla cDNA připravena s náhodnými hexanukleotidy (Roche) dle následujícího protokolu:

Reagencie	Objem [μ l]
2 μ g RNA ošetřené DNázou	26,4
Hexanukleotidy (30pmol/ μ l)	1,0
50x dNTPs	1,6
65°C (10 min); na led.	
DTT	2,0
5x pufr	8,0
SSIII	1,0
25°C (5 min); 50°C (50 min); 70°C (15 min); na led (∞)	

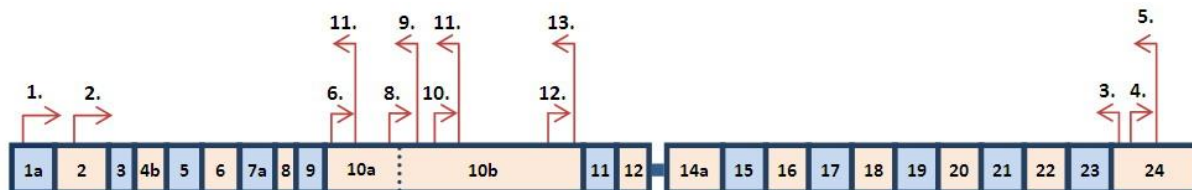
Syntéza byla provedena bezprostředně před vlastní qPCR analýzou, vzorky cDNA byly do dalšího použití uloženy v +4°C.

3.4 Amplifikace ASV BRCA1

3.4.1 Návrh primerů pro PCR amplifikaci BRCA1 z cDNA a sekvenování

Návrh primerů v sekvenci mRNA BRCA1 (NM_007294.3; GI:237757283) byl proveden s využitím programu AnnHyb (Bioinformatics.org), ve kterém byla provedena analýza T_m , predikce tvorby vlásenek a primer-dimerů. Primery byly navrženy s ohledem na blízkou T_m umožňující zjednodušení PCR amplifikace a vzájemnou kombinovatelnost primerů. Jedinečnost sekvencí primerů v lidském genomu byla ověřena aplikací BLAST (ncbi.nlm.nih.gov).

Rozmístění jednotlivých primerů v sekvenci BRCA1 mRNA (full-length wt forma transkriptu) je schematicky znázorněno na obrázku 14. Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 3.



Obrázek 14: Schéma rozmístění a směr jednotlivých primerů v sekvenci mRNA wt BRCA1.

Tabulka 3: Primery pro amplifikaci a sekvenaci ASV BRCA1:

	Primer (lokalizace)	Sekvence (5'-3')
1.)	B1SP01F (5'-UTR – FWD)	TCAGATAACTGGGCCCTGCG
2.)	B1SP02F (exon 2 – FWD)	TCTGCTCTTCGCGTTGAAGAAGTACA
3.)	B1SP06R (3'-UTR – REV)	GCCTGGAAAGGCCACTTTGTAAGC
4.)	B1SP16F (3'-UTR – FWD)	CAAGAATGAGCTTACAAAGTGGCC
5.)	B1SP17R (3'-UTR – REV)	ACCCTTGCATAGCCAGAAGTC
6.)	B1SP08F (exon 10a – FWD)	TGCTTGTGAATTTTCTGAGACGG
7.)	B1SP09R (exon 10a – REV)	CTCTCAGCTGCACGCTTC
8.)	B1SP10F (exon 10a – FWD)	GAAGCGTGCAGCTGAGAG
9.)	B1SP11R (exon 10b – REV)	CTCATGCTGTAATGAGCTGGC
10.)	B1SP12F (exon 10b – FWD)	GCCAGCTCATTACAGCATGAG
11.)	B1SP13R (exon 10b – REV)	CAGCCCATCTGTTATGTTGGC
12.)	B1SP14F (exon 10b – FWD)	GGCAAAGGCATCTCAGGAAC
13.)	B1SP15R (exon 10b – REV)	CTCAGACCAACTCCCTGGC

Pozn.: FWD = forward; REV = reverse

3.4.2 PCR amplifikace sestřihových variant BRCA1

Pro amplifikaci sestřihových variant BRCA1 byla využita cDNA syntetizovaná z celkové RNA s oligo-dT primery. PCR probíhala ve dvou krocích, díky kterým jsme mohli detekovat i amplikony nízko exprimovaných ASV BRCA1. **První PCR** probíhala za využití polymerázy s proof-reading aktivitou a schopností amplifikace dlouhých amplikonů (TaKaRa LA Taq, Takara), dle rozpisu (pro 10 μ l reakci):

TaKaRa LA Taq (5 U/ μ l)	0,1 μ l
10x LA PCR pufr II (Mg ²⁺ plus)	1.0 μ l
dNTP Mix (Takara; 2,5 mM každý)	1,6 μ l
Templát (cDNA)	0,5 μ l
Primer B1SP02F (30 μ M)	0,1 μ l
Primer B1SP17R (30 μ M)	0,1 μ l
ddH ₂ O	6,6 μ l

Příprava PCR probíhala v chlazeném stojánku (4 °C). PCR amplifikace zahrnovala, po úvodní denaturaci (95 °C – 1 min), 35 cyklů (94 °C – 15 s; 60 °C – 30 s; 68 °C – 8 min) a závěrečné dosyntetizování amplikonů (72 °C – 10 min).

Ve **druhé PCR** (o celkovém objemu 25 µl) byl jako templát použit 1 µl 800 x zředěného vzorku z první amplifikace a reakce proběhla se směsí polymeráz LA DNA Polymerases Mix (TopBio), dle protokolu:

LA DNA Polymerases Mix (5 U/µl)	0,25 µl
10x LA PCR reakční pufr	2,5 µl
DMSO	0,5 µl
dNTP Mix (TopBio; 10 mM každý)	1,25 µl
25 mM MgCl ₂ (konečná konc. 3 mM)	2,25 µl
Templát (800x ředěná 1. PCR)	1,25 µl
Primer B1SP02F (30 µM)	0,25 µl
Primer B1SP06R (30 µM)	0,25 µl
ddH ₂ O	16,5 µl

Program pro druhou amplifikaci probíhal dle stejného protokolu jako u první PCR s rozdílem 25 cyklů místo 35 a rozdílnou T_m primerů (64 °C).

3.4.3 Elektroforéza PCR amplikonů

Kontrolní elektroforetické separace byly prováděny v 0,7% agarózovém gelu (Serva) vloženém do 1x TBE pufru při napětí 8 V/cm délky gelu. Pro separace dlouhých fragmentů s vysokým rozlišením (1000 – 7000 bp) bylo použito 1% agarózového gelu SeaKem GTG Agarose (Lonza) v 1x TBE pufru při napětí 6 V/cm gelu. Pro separaci krátkých fragmentů s vysokým rozlišením (100-1000 bp) bylo použito 1,7% agarózového gelu MetaPhor Agarose (Lonza) v 1x TBE pufru při napětí 8 V/cm gelu za stálé teploty 25 °C.

Vkládací pufr (6 x LD) obsahoval 0,25% bromfenolové modři (Sigma), 0,25% xylencyanolu ve 40% glycerolu (w/w). K zobrazení nukleových kyselin na UV transluminátoru bylo použito fluorescentní barvivo GelRed (Biotium) přidané do gelu při jeho přípravě dle protokolu výrobce. Přibližná identifikace délky fragmentů byla provedena

srovnáním s migrací velikostního standardu GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) s fragmenty v rozmezí 100 – 10 000 bp.

3.4.4 Izolace fragmentů DNA z gelu, purifikace a reamplifikace

Amplikony reprezentující jednotlivé ASV BRCA1 byly, po elektroforetické separaci vzorku PCR, vyříznuty z gelu a purifikovány za použití QIAquick Gel Extraction Kitu (Qiagen) dle protokolu výrobce. Vzorek DNA byl eluován ddH₂O při teplotě 70 °C o objemu 30 µl. Kvůli nízké koncentraci eluované DNA, byl vzorek reamplifikován (viz kapitola 3.4.2 „*druhá PCR*“) s tím rozdílem, že vzorek templátového eluátu nebyl ředěn.

3.5 Charakterizace ASV BRCA1

3.5.1 Sekvenace DNA

PCR produkty byly před sekvenační reakcí ošetřeny kitem ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Affymetrix) obsahujícím exonukleázu I (hydrolyzující jednořetězcovou DNA - primery) a alkalickou fosfatázu (hydrolyzující fosfátové skupiny neinkorporovaných nukleotidů), které by jinak interferovaly se sekvenační reakcí.

Sekvenační reakce o celkovém objemu 5 µl obsahovala 1 µl BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), 1 µl 5 x sekvenačního pufru (Applied Biosystems), 0,2 µl primeru (30 µM) a 2,8 µl vzorku ošetřeného ExoSAP-ITem.

Analýza sekvenační reakce byla provedena na analyzátoru ABI3130 (Applied Biosystems) se softwarem Gene Mapper v.4.0. K analýze sekvencí byl použit program FinchTV 1.3.1 (Geospiza, Inc.).

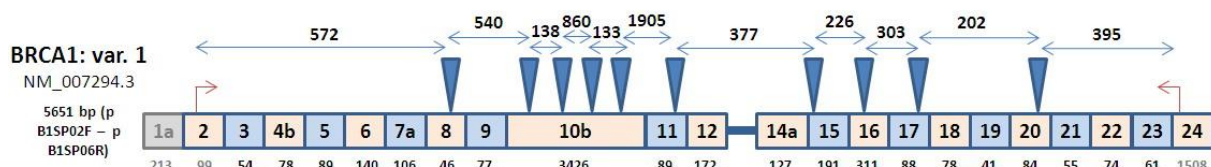
3.5.2 Restrikční analýza

Identifikace ASV pomocí sekvenování je nákladný a zdlouhavý proces. Pro zjednodušení identifikace ASV bylo provedeno restrikční mapování produktů amplifikace ASV BRCA1 z cDNA připravené ze vzorků RNA z periferní krve.

Restriční místa v ampliconech obsahujících různé ASV BRCA1 byla analyzována v online aplikaci WebCutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>). Jako nejvhodnější byla vybrána restriční endonukleáza *AcuI* (*Eco57I*), rozeznávající rekogniční místo:

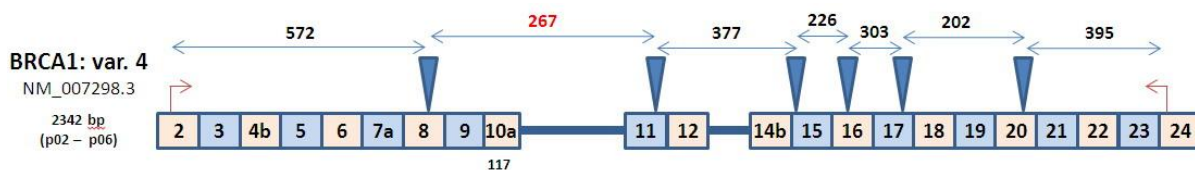


AcuI štěpí amplicon BRCA1 (s primery lokalizovanými v exonu 2 a 3'UTR) zahrnující referenční variantu 1 (wt BRCA1; NM_007294.3) na 10 místech:



Obrázek 15: Schéma restričních míst a velikosti vzniklých fragmentů v sekvenci wt mRNA BRCA1.

Amplicon referenční varianty 4 (BRCA1a; NM_007298; varianta s krátkou formou exonu 10 - exonem 10a) je štěpen na 6 místech:



Obrázek 16: Schéma restričních míst a velikosti vzniklých fragmentů v sekvenci mRNA BRCA1a.

Restriční reakce obsahovala 1 μ l PCR produktu, 0,5 μ l (2,5 U) *AcuI* (NEB), 0,8 μ l pufru 10x NEBuffer 4 (NEB), 0,01 μ l 40 μ M S-adenosylmethioninu a 5,69 μ l ddH₂O. Restriční reakce byla inkubována při 37 °C po dobu 3 hodin. Elektroforetická separace fragmentů poté probíhala na MetaPhor agaróze (viz 3.9 Elektroforéza...).

3.6 Kvantifikace exprese ASV BRCA1 pomocí qPCR

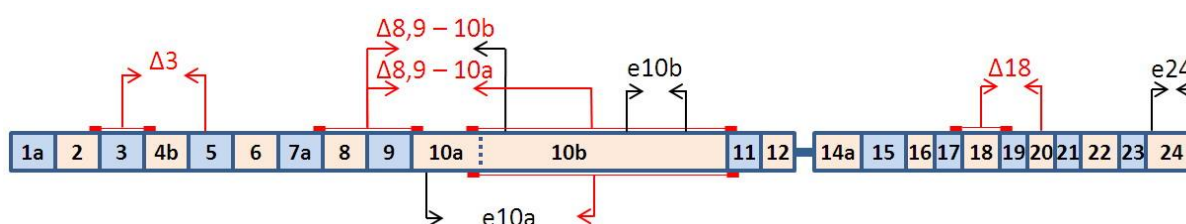
Kvantitativní RT-PCR v reálném čase (qPCR) umožňuje kvantifikaci genové exprese sledovaných genů na úrovni mRNA (resp. cDNA). Metoda je založena na měření míry fluorescence (emitované fluorochromy schopné nespecifické vazby na dsDNA – v našem případě SYBR Green) v každém cyklu, která s narůstajícím množstvím produktu roste přímo úměrně.

3.6.1 Příprava qPCR analýzy ASV BRCA1:

PCR primery pro kvantifikaci míry exprese vybrané sestřihové varianty ($\Delta 3$, $\Delta 18$, $\Delta 8-9$ v kombinaci s e10a a $\Delta 8-9$ v kombinaci s e10b), resp. cílového exonu genu *BRCA1* (e24, e10a a e10b) byly navrženy na nově vzniklá exon-exonová spojení (Tab. 4; Obr. 17), abychom mohli specificky sledovat danou formu ASV *BRCA1* mRNA. Všechny primery byly navrženy na anelační teplotu 59 – 60°C, byla provedena predikce tvorby vlásenek, primer-dimerů a zkontrolována jejich specifčnost. Velikost qPCR produktů byla v rozmezí 130 – 204 bp. Páry primerů byly naředěny na pracovní koncentraci 2,5 μ M každý.

Tabulka 4: Sekvence specifických párů primerů pro jednotlivé ASV s velikostmi ampliconů, které tvoří.

Název ASV BRCA1	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	PCR fragment (bp)
e24	CAAGAATGAGCTTACAAAGTGGCC	GACTTCTGGCTATGCAAGGGT	130
e10a	TGCTTGTGAATTTTCTGAGACGG	GTATCAGGGTGAAGCAGCATCTG	131
e10b	GGCAAAGGCATCTCAGGAAC	GCCAGGGAGTTGGTCTGAG	180
$\Delta 3$	GTCCCATCTGATTTTGCATGCTG	GTGCTTTTCAGCTTGACACAGG	169
$\Delta 8,9 - 10a$	GTCTACATTGAATTGGCTGCTTGTG	GTATCAGGGTGAAGCAGCATCTG	148
$\Delta 8,9 - 10b$	GTCTACATTGAATTGGCTGCTTGTG	GCCAGCTCATTACAGCATGAG	204
$\Delta 18$	CATGTTGTTATGAAAACAGGGGTGAC	GAGCAAGAGAATCCCAGGACAG	140



Obrázek 17: Schématické vyznačení pozice specifických primerových párů pro qPCR analýzu. Červeně jsou vyznačeny primery či páry navržené specificky pro analýzu vybraných sestřihových varianty, černě jsou vyznačeny primery navržené dříve pro amplifikaci či sekvenování *BRCA1* (viz kapitola 3.4.1 *Návrh primerů pro PCR amplifikaci BRCA1 z cDNA*).

Pro větší flexibilitu byl pro qPCR vizualizaci zvolen systém obsahující SYBR Green (LC480 SYBR Green I Master), vlastní pokus byl prováděn na přístroji LightCycler 480 (vše Roche). qPCR byla provedena podle doporučení výrobce v reakci o objemu 10 μ l obsahující 1

μl cDNA, 5 μl 2x SYBR Green PCR MIX, 2 μl směsi forward a reverse primeru (2,5 μM každý) a 2 μl ddH₂O.

Byla provedena optimalizace anelačních teplot (T_m) a pro celý projekt byla jako vhodná zvolena $T_m = 62^\circ\text{C}$. Výsledný protokol qPCR je rozepsán:

Krok qPCR	Teplota [$^\circ\text{C}$]	Délka trvání	Měření fluorescence	Počet
Vstupní denaturace	95	10min	-	1
Amplifikace				45
• Denaturace	95	10 s		
• Anelace	62	10 s		
• Elongace	72	8 s	+	
Křivka tání	68 - 95	~3 min	+++	1
Chlazení	40	∞	-	1

Specifičnost qPCR a jejich produktů byla v rámci optimalizací ověřena analýzou křivky tání v programu LightCycler 480 software (ver. 1.5.0; Roche), elektroforézou qPCR produktů ve 2% agarózovém gelu a přímým sekvenováním qPCR produktů. Standardně byly prováděny negativní kontroly qPCR (obsahující stejný MMX, pouze templátová cDNA byla nahrazena ddH₂O). Všechna měření byla prováděna v nezávislých dvojicích.

3.6.2 Příprava kalibračních křivek

Pro všechny geny byly za optimálních reakčních podmínek zkonstruovány kalibrační křivky z dilučních řad cDNA, ze kterých byla následně stanovena efektivita jednotlivých typů qPCR. K přípravě 40 μl cDNA pro konstrukci kalibračních křivek bylo použito 8 μg DNázou ošetřené RNA z buněčné linie MCF-7. Množství cDNA (resp. RNA) použitá pro konstrukci kalibrační křivky na reakci (10μl) byla: 200; 100; 50; 25; 10; 1,0 a 0,1 ng.

S ohledem na nutnost porovnávat v rámci prováděného projektu mezi sebou míru genové exprese jednotlivých sestřihových variant bylo nutno vyloučit možnost preferenční amplifikace některého ze sledovaných ampliconů v důsledku např. vyšší afinity navržených primerů ke svému templátu. Pro konstrukci kalibračních křivek pro absolutní kvantifikaci byly použity specifické PCR produkty (pokrývající exony a sestřihové varianty našeho zájmu). Spektrofotometricky (NanoDrop 1000) byla stanovena koncentrace PCR produktů, které byly 10x naředěny, poté byly v tripletu znovu stanoveny koncentrace ng/μl, které byly použity pro přepočítání na koncentraci v počtu templátů / μl podle následujícího vzorce:

$$\text{Konc. vzorku molekuly } \mu\text{l} = \frac{\text{koncentrace vzorku ng } \mu\text{l} \times 6.022 \times 10^{23}}{656,6 \times 10^9 \times a}$$

kde *a* označuje délku PCR produktu v bp.

Následně byly všechny specifické PCR produkty naředěny na koncentraci 10^{10} templátů/μl. Z nich byl připraven směsný roztok všech osmi cílových sekvencí, ve kterém byla každá z nich o koncentraci 10^9 templátů/μl (ředění 10x: 50 μl každého z osmi PCR produktů o koncentraci 10^{10} templátů/μl a 100 μl ddH₂O). Z takto získaného pracovního roztoku qPCR templátů byla dilucí získána kalibrační řada o koncentracích 10^9 , 10^7 , 10^5 , 10^3 , 10^2 , 10 a 1 každého z osmi templátů/μl, která byla použita pro konstrukci kalibračních křivek qPCR.

3.6.3 Kvantifikace změn exprese jednotlivých ASV a jejich statistické vyhodnocení

Míra relativní exprese jednotlivých sledovaných ASV byla hodnocena softwary umožňujícími zohlednit při analýze efektivity amplifikace jednotlivých qPCR.

Pro hodnocení relativní míry exprese sledovaných genů v jednotlivých typech tkání napříč vyšetřovanými skupinami byl použit software qGENE (<http://www.qgene.org>), který je aplikací do tabulkového kalkulátoru Excel (Microsoft) a umožňuje hodnotit míru exprese sledovaného genu proti jednomu referenčnímu genu u každého jednotlivého vzorku.

Dynamika změn relativní exprese u sledovaných genů mezi jednotlivými skupinami byla hodnocena pomocí kvantifikačního softwaru REST (Relative Expression Software Tool) 2008 ver. 2.0.7 (Corbett Research Pty. Ltd; Pfaffl, 2001; Pfaffl et al., 2002).

Pro normalizaci vstupního množství templátové cDNA a hodnocení míry relativní exprese BRCA1 ve vyšetřovaných tkáních byl pro tento projekt zvolen ubikvitin C (UBC), který byl v předchozích pokusech prováděných na pracovišti vybrán pro tento typ analýz (exprese v párových vzorcích nádor/nenádor a sledovaných typech tkání) jako vhodný referenční gen. Hodnocení míry exprese sledovaných ASV BRCA1 bylo normalizováno na míru exprese exonu 24 genu BRCA1 (Favy et al, 2000).

Získaná data byla hodnocena pomocí statistického programu SigmaStat. Rozdíly v jednotlivých sledovaných parametrech mezi vyšetřovanými skupinami byly vyhodnoceny pomocí jednocestného ANOVA testu. Při neparametrickém rozložení dat ve vyšetřovaných souborech byl použit neparametrický Kruskal-Wallisův test. Pro analýzu vzájemných korelací posuzovaných parametrů napříč skupinami byl použit Spearmanův korelační test.

4 VÝSLEDKY

4.1 Optimalizace systému pro identifikaci ASV BRCA1

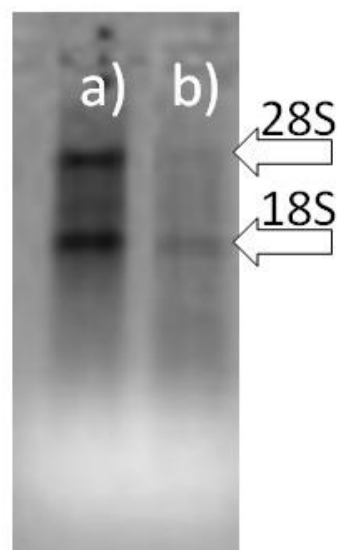
Z důvodu omezeného množství celkové RNA získané od vyšetřovaných subjektů probíhala optimalizace metod, nezbytných pro identifikaci ASV BRCA1, s celkovou RNA z buněčné linie MCF-7. Ta sloužila k optimalizaci reverzní transkripce a následné PCR umožňující amplifikaci různých ASV BRCA1 díky jejich sdíleným 5'-UTR a 3'-UTR sekvencím, ve kterých byly lokalizovány amplifikační primery (B1SP01F a B1SP06R). Další optimalizace probíhaly již na vzorcích RNA izolovaných z periferní krve.

4.1.1 Optimalizace izolace RNA ze tkání

Pro izolaci celkové RNA z mamární a přilehlé tukové tkáně (obě s vysokým obsahem lipidů) jsme vyzkoušeli RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen) a MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit na izolátoru MagNA Pure Compact (Roche). Test proběhl na 10 paralelně zpracovávaných vzorcích. Izolace pomocí kitu MagNA Pure Compact RNA Isolation proběhla dle protokolu výrobce, izolace pomocí RNeasy Lipid Tissue Mini proběhla dle upraveného protokolu (kapitola 3.3.1 – *Izolace celkové RNA z tkáňových vzorků*).

Výsledky izolace celkové RNA vyzněly ve prospěch RNeasy Lipid Tissue Mini kitu. Spektrofotometricky naměřená průměrná koncentrace celkové RNA byla 128 ng/μl (Obr. 18a) ve srovnání s nižším průměrným výtěžkem RNA získané z automatického izolátoru (15,7 ng/μl; Obr. 18b). Průměrná čistota RNA byla v obou případech srovnatelná [$A_{260}/A_{280} = 2,02$ (Qiagen) vs. 2,00 (izolátor)].

V rámci přípravy vzorku jsme optimalizovali fragmentaci tkáně – dobu fragmentace a počet opakování na přístroji MagNA Lyzer. Nejvhodnější byla fragmentace 3 x 15 s chlazením vzorku na ledu.



Obrázek 18: Příklad elektroforézy celkové RNA izolované **a)** pomocí RNeasy Lipid Tissue Mini kitu a **b)** MagNA Pure Compact RNA Isolation kitem na izolátoru MagNA Pure Compact. **Bílými šipkami** jsou vyznačeny pozice 28S a 18S RNA ribozomálních podjednotek.

Vzhledem k vysokému obsahu tukové tkáně ve vyšetřovaných vzorcích a díky výsledkům z optimalizačních experimentů jsme se rozhodli celkovou RNA z mamární a přilehlé tukové tkáně izolovat pomocí RNeasy Lipid Tissue Mini kitu (Qiagen).

4.1.2 Optimalizace reverzní transkripce

Po izolaci celkové RNA byla provedena reverzní transkripce s využitím reverzní transkriptázy SuperScript III, která se rutinně používá v naší laboratoři. Charakterizace ASV BRCA1 vyžadovala použití oligo-dT primeru pro syntézu dlouhých cDNA molekul nezbytných k amplifikaci plné délky sekvence mRNA ASV BRCA1 (včetně jejich 5' a 3' UTR). Z těchto důvodů jsme přikročili k důkladné optimalizaci množství SSIII, koncentrace oligo-dT primeru a koncentrace dNTPs v reakci (Tab. 5).

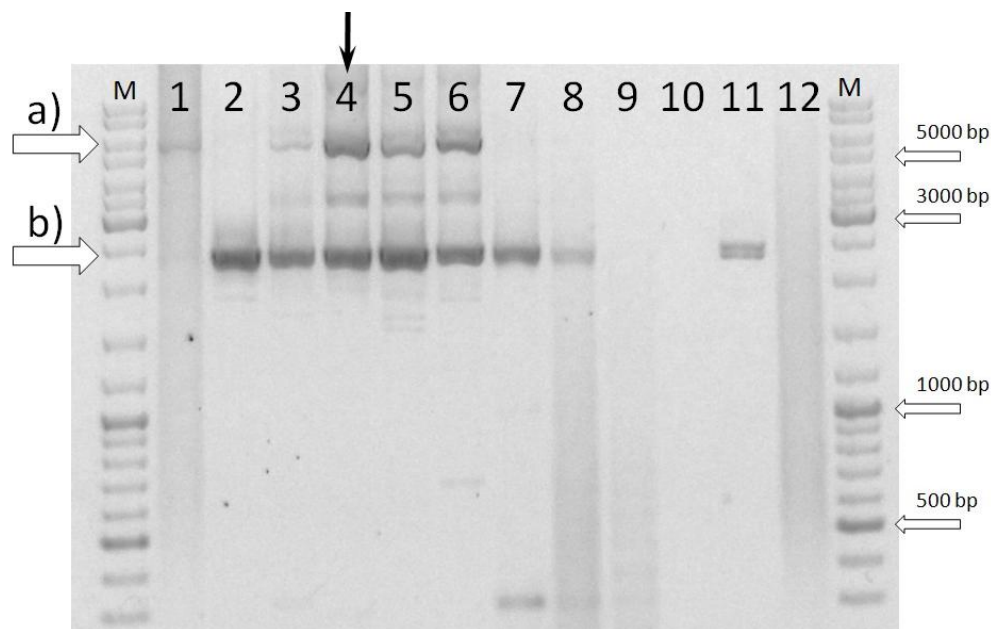
Znakem dobře amplifikovaných ASV BRCA1 jsou dva majoritní amplikony, větší o přibližné velikosti 5700 bp odpovídá mRNA wt BRCA1 a menší o přibližné velikosti 2400 b odpovídá BRCA1a (varianta s krátkým exonem 10a). Wt varianta se obecně obtížněji amplifikuje, takže veškeré optimalizační reakce směřovaly k výsledku s co nejvyšším poměrem wt BRCA1 amplikonu oproti kratšímu BRCA1a.

Tabulka 5: Optimalizace reverzní transkripce. Červeně je vyznačeno složení směsi, které bylo kontrolní PCR vyhodnoceno jako optimální pro nejlepší výsledek reverzní transkripce.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RNA (1µg)	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75
ddH ₂ O	1,6	1,4	1,15	1,35	1,15	1,1	0,9	0,85	0,6	0,4	0,15	0
oligo-dT	0,5	0,5	0,75	0,5	0,5	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	1	1
50x dNTPs	0,4	0,6	0,6	0,4	0,6	0,4	0,6	0,4	0,4	0,6	0,6	0,75
65 °C 10min, poté na led												
DTT	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
5x buffer	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
SS3	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1

Pozn.: Hodnoty uvedené v tabulce jsou v µl.

Reakce probíhaly v celkovém objemu 10 µl. Jako templát byl použit 1 µg celkové RNA (z buněčné linie MCF7-7). Reverzní transkripci předcházelo ošetření DNázou (viz kapitola 3.3.4 *Syntéza cDNA*). Výsledky kontrolní elektroforézy prokázaly, že optimální podmínky pro syntézu cDNA k analýze ASV BRCA1 zahrnují použití 0,5 µl oligo-dT, 0,5 µl reverzní transkriptázy SuperScript III, 0,4 µl 50x dNTPs (Obr. 19, vzorek č. 4).



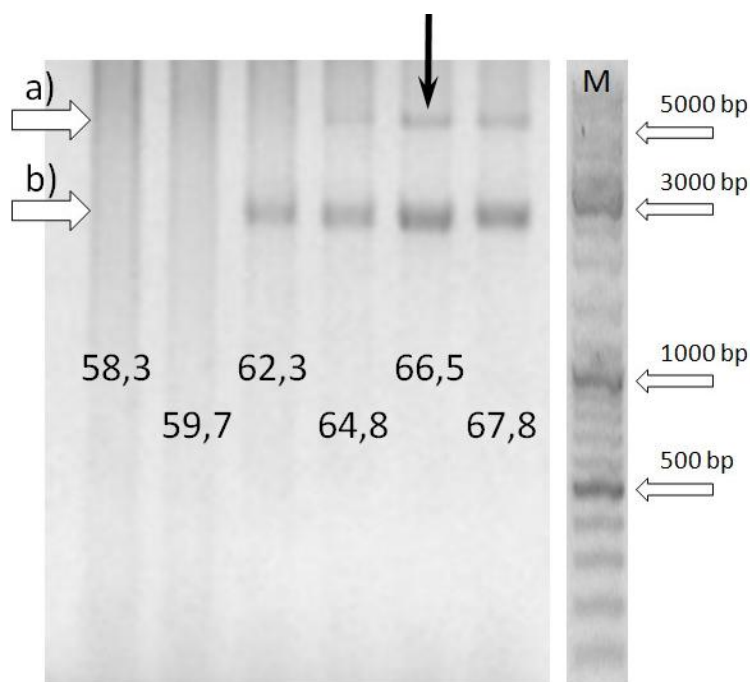
Obrázek 19: Optimalizace reverzní transkripce. Jednotlivé kombinace množství reverzní transkriptázy, oligo-dT a dNTPs z tabulky 5 jsou vyznačeny čísly 1-12, bílou šipkou a) je vyznačena velikost odpovídající amplikonu wt BRCA1, b) je vyznačena velikost odpovídající amplikonu BRCA1a. M - velikostní standard (marker). Černou šipkou je označen vzorek s nejvyšší účinností amplifikace.

4.1.3 Optimalizace průběhu PCR amplifikace

Před provedením PCR bylo třeba věnovat pozornost optimalizaci podmínek amplifikace. Anelační teplota (T_m) ovlivňuje výslednou specifičnost PCR. Při nízké teplotě primery nespécificky nasedají na nekomplementární místa nebo tvoří tzv. primer-dimery či vlásenky (hairpins). Vysoká teplota naopak znemožňuje hybridizaci (anelaci) primerů s cílovou sekvencí a vede ke snižování účinnosti PCR (shrnutí v (Bartlett a Stirling, 2003)).

Optimalizace T_m probíhaly v objemu 5 μ l s identickým složením PCR směsi v cykleru PTC-DyAD (BioRad) s gradientovým blokem. Amplifikace (viz kapitola 3.4.2 *PCR amplifikace sestřihových variant BRCA1* – první PCR) byla provedena dle stejného protokolu v gradientu T_m v rozmezí 58 – 68 °C.

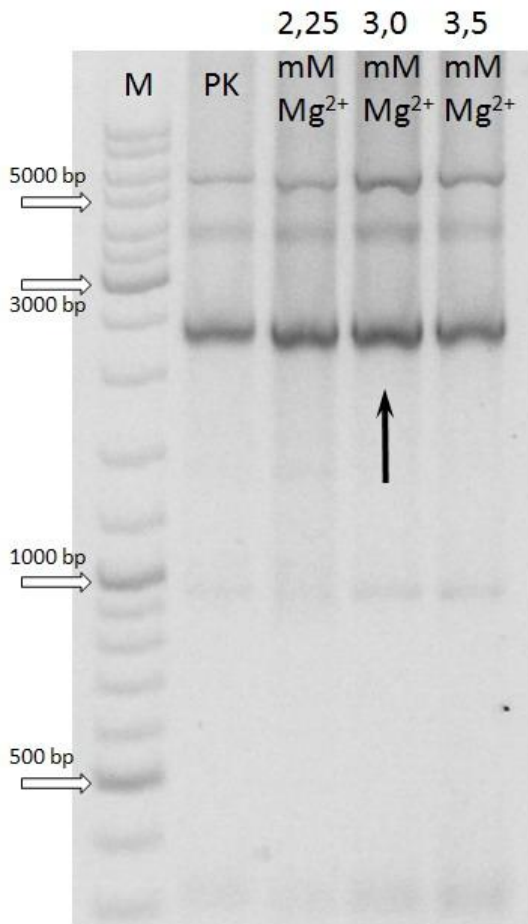
Za optimální T_m byla zvolena teplota 66,5 °C, při které byly přítomny specifické amplikony v nejvyšší koncentraci (Obr. 20)



Obrázek 20: Příklad kontrolní elektroforézy optimalizace PCR amplifikace z cDNA s primery lokalizovanými v 5'-UTR a 3'-UTR BRCA1 (B1SP01F a B1SP06R). Čísla odpovídají T_m (°C). **Bílou šipkou a)** je vyznačen amplikon o velikosti odpovídající wt mRNA BRCA1 (5734 bp) a šipkou **b)** je vyznačena velikost odpovídající mRNA sestřihové varianty BRCA1a (se zkrácenou formou exonu 10; 2425 bp). **M** - velikostní standard (marker). **Černou šipkou** je označena reakce s nejvyšší účinností.

Kromě optimalizace T_m byly pro jednotlivé reakce provedeny optimalizace koncentrace Mg^{2+} ovlivňující výtěžnost a přesnost replikace templátové DNA. Amplifikace pomocí LA

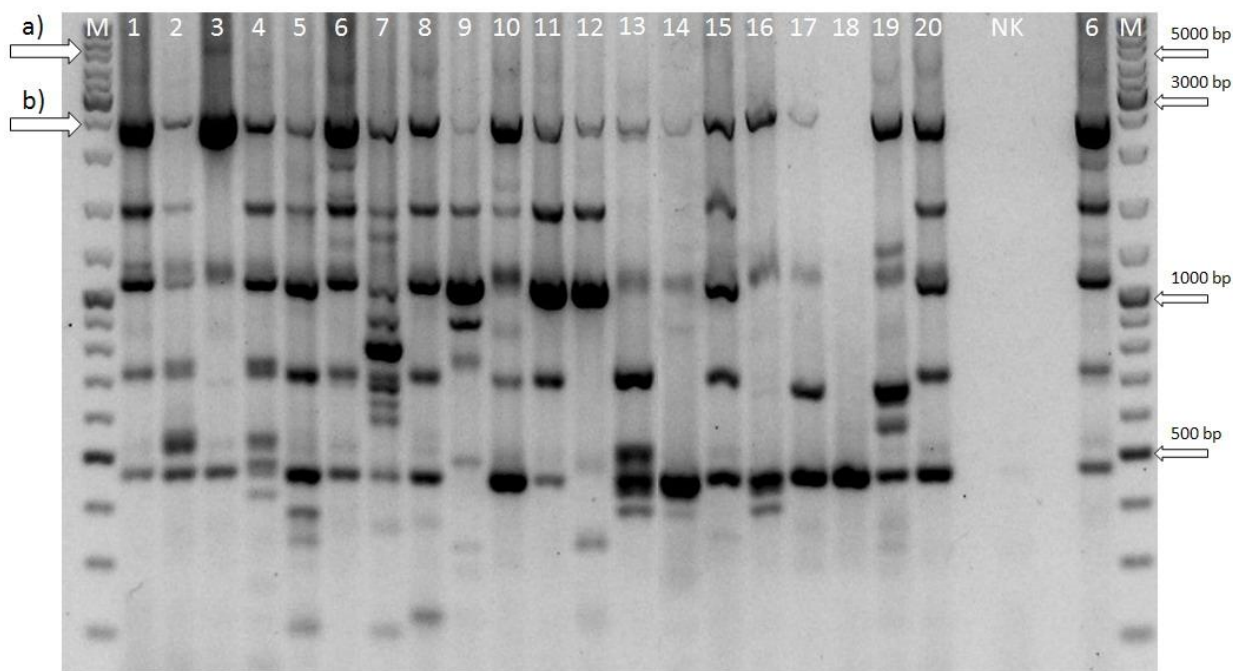
Taq polymerázy obvykle vyžaduje vyšší koncentraci Mg^{2+} , než amplifikace pomocí běžných Taq polymeráz, u kterých je optimální koncentrace Mg^{2+} 1,5 mM. Optimalizace koncentrace Mg^{2+} probíhaly v objemu 5 μ l s PCR směsí lišící se pouze koncentrací Mg^{2+} (2,25; 3,0; 3,5 mM; Obr. 21).



Obrázek 21: Optimalizace množství Mg^{2+} v PCR reakci. Černou šipkou je vyznačena dráha s koncentrací hořečnatých kationtů v mM, při které byla účinnost PCR amplifikace nejvyšší. **M** - velikostní standard (marker). **PK** je označena pozitivní kontrola.

4.1.4 Optimalizace primerů pro charakterizaci ASV BRCA1

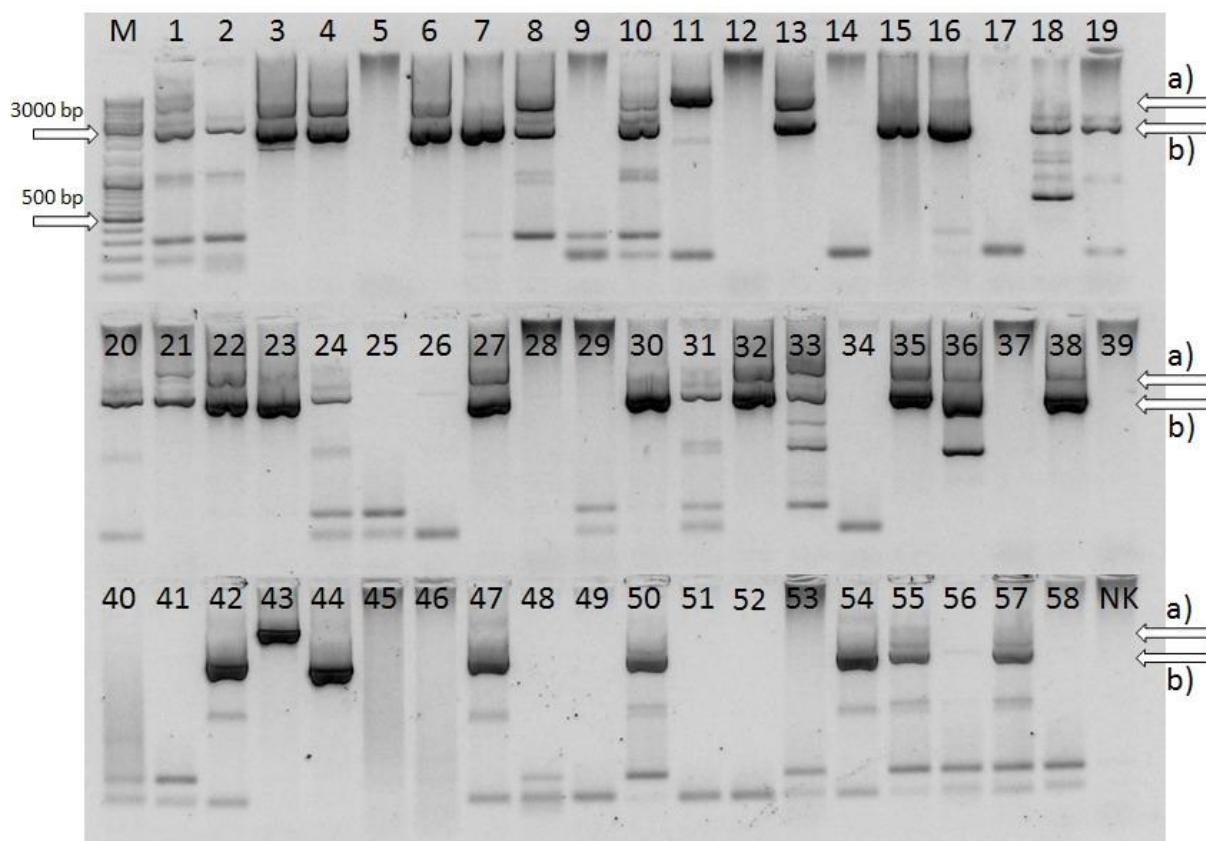
Po optimalizaci reverzní transkripce a PCR amplifikace na vzorcích RNA z MCF-7 jsme přistoupili k prvním experimentům na vzorcích RNA z periferní krve (vzorky periferní krve 1 – 20). Provedli jsme reverzní transkripci a následnou amplifikaci s primery lokalizovanými v 5'- a 3'-UTR (B1SP01 a B1SP06). Vzorky jsme amplifikovali ve dvoustupňové PCR (druhá PCR byla provedena za identických podmínek s templátem první PCR).



Obrázek 22: Příklad elektroforézy po druhém kroku amplifikace ASV BRCA1 vzorků z periferní krve (vzorky 1-20) s primery v 5'-UTR a 3'-UTR BRCA1 mRNA (B1SP01F a B1SP06R). Šipka **a**) vyznačuje pozici ampliconu wt BRCA1 a šipka **b**) pozici ampliconu BRCA1a (s krátkou variantou exonu 10). **M** - velikostní standard (marker). **NK** je negativní kontrola.

Pozn.: Vzorek 6 byl na elektroforézu nanesen dvakrát.

Tímto přístupem se podařilo amplifikovat wt variantu BRCA1 (amplicon o velikosti 5734 bp) jen u části vzorků a pouze ve velmi nízké koncentraci. Amplifikoval se však vysoký počet výrazně kratších variant, které jsme doposud nikde neidentifikovali. Dominantní byly varianty o přibližné velikosti 480 bp, 620 bp, 1100 bp a 1500 bp. Sekvenováním jsme analyzovali několik krátkých ampliconů odpovídajících ASV BRCA1 s rozsáhlými výpadky [$\Delta 2-19+\Delta 22$ (448 bp); $\Delta 2-17$ (635 bp); $\Delta 2-21+\text{insIVS21}+837_1001+\text{insIVS21}-776_588$ (691 bp)]. Tyto varianty postrádají většinu kódující sekvence včetně iniciačního arbitrárního translačního AUG kodonu v exonu 2 (i alternativního AUG v začátku exonu 4). Je tedy vysoce nepravděpodobné, že by mohlo dojít k přepisu těchto variant do proteinového produktu. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli, že pro amplifikaci posuneme forward primer do oblasti těsně za arbitrárním translačním AUG kodonem v exonu 2. Tato změna vedla k redukci amplifikace ASV BRCA1 s výpadkem exonu 2, které se pravděpodobně netranslatují (Obr. 23)



Obrázek 23: Příklad elektroforézy amplifikovaných ASV BRCA1 ze vzorků periferní krve 1-58. **Bílá šipka** ukazuje **a)** velikost odpovídající ampliconu wt BRCA1, **b)** velikost odpovídající BRCA1a. **M** – velikostní standard (marker). **NK** - negativní kontrola. Amplicony s velikostí <500 bp jsou amplifikáty rozsáhlých výpadků BRCA1 [Δ 3-23(vzorek 34) a Δ 3-23 se sekvencí z intronu 23 o přibližné délce 120 bp]

Výsledek PCR amplifikace s primery v exonu 2 (B1SP02F) a 3'-UTR (B1SP06R, respektive B1SP17R v prvním kroku této semi-nested PCR amplifikace) se zásadním způsobem liší od původní amplifikace s primerem lokalizovaným v 5'-UTR (primer B1SP01).

Změnou lokalizace forward primeru (posunutím do exonu 2) jsme tedy omezili amplifikaci krátkých variant s nejasným významem a docílili jsme snížení preferenční amplifikace krátkých (do 1500 bp) ASV na úkor dlouhých ASV BRCA1 (nad 2000 bp).

4.1.5 Elektroforetická separace ampliconů se sestřihovými variantami

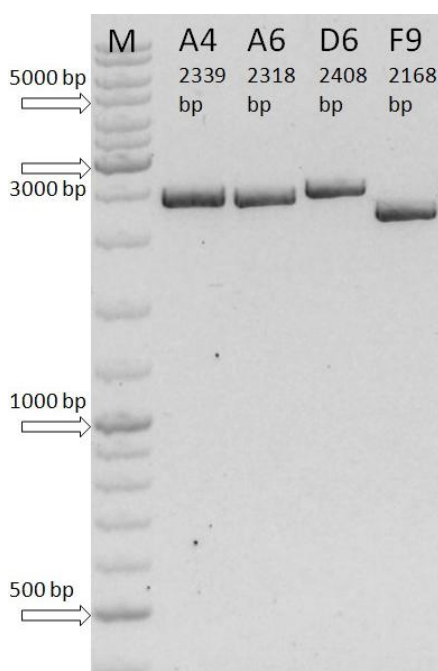
Na základě předchozích výsledků analýz BRCA1 u pacientů s karcinomem prsu (Pohlreich et al. 2006) jsme předpokládali, že častými ASV budou varianty, které pozbývají některý (-é) z krátkých exonů lokalizovaných před a za nejdelším exonem 10b. Z tohoto důvodu jsme potřebovali docílit vysoké rozlišovací schopnosti gelové elektroforézy. Protože analýza

amplikonů odpovídajících jednotlivým ASV ve směsných vzorcích pomocí extrakce z gelu a následného sekvenování či klonování by byla velice zdlouhavá a nákladná, rozhodli jsme se podrobit amplifikované směsné vzorky restričnímu štěpení. Na základě získaných restričních map jsme mohli identifikovat přítomné ASV BRCA1. Tento postup vyžadoval precizní elektroforetickou separaci. K její optimalizaci byly vybrány jednotlivé charakterizované ASV BRCA1 z buněčné linie MCF7 zaklonované ve vektoru pNEB206A (NEB; <http://www.neb.com/nebecomm/ManualFiles/manualE5500.pdf>), které byly k dispozici v naší laboratoři. Jednotlivé sestřihové varianty mají velikosti odvozené od BRCA1a, tedy obsahují krátký alternativní exon 10a (amplikon s primery v exonu 2 a 3'-UTR má velikosti 2342 bp; Tab 6).

Tabulka 6: Delece, inserce a celková velikost ASV BRCA1 z buněčné linie MCF-7 zaklonovaných ve vektoru pNEB206A použitých k otestování elektroforézy s vysokým rozlišením a optimalizaci restričního mapování.

Název varianty:	Delece:	Inzerce:	Velikost amplikonů (exon 2 a 3'-UTR)
A4 (BRCA1a)			2342 bp
A6	21 bp exon 4, 3 bp exon 5		2318 bp
D6	3 bp exon 7	123 bp intron 2	2408 bp
F9	3 bp exon 7, Δ8-9, 20bp exon 10a, 25 bp exon 11		2168 bp

Vzorky jsme analyzovali agarózovou gelovou elektroforézou s vysokou rozlišovací schopností (v rozsahu 1000 – 7000 bp; Obr. 24).

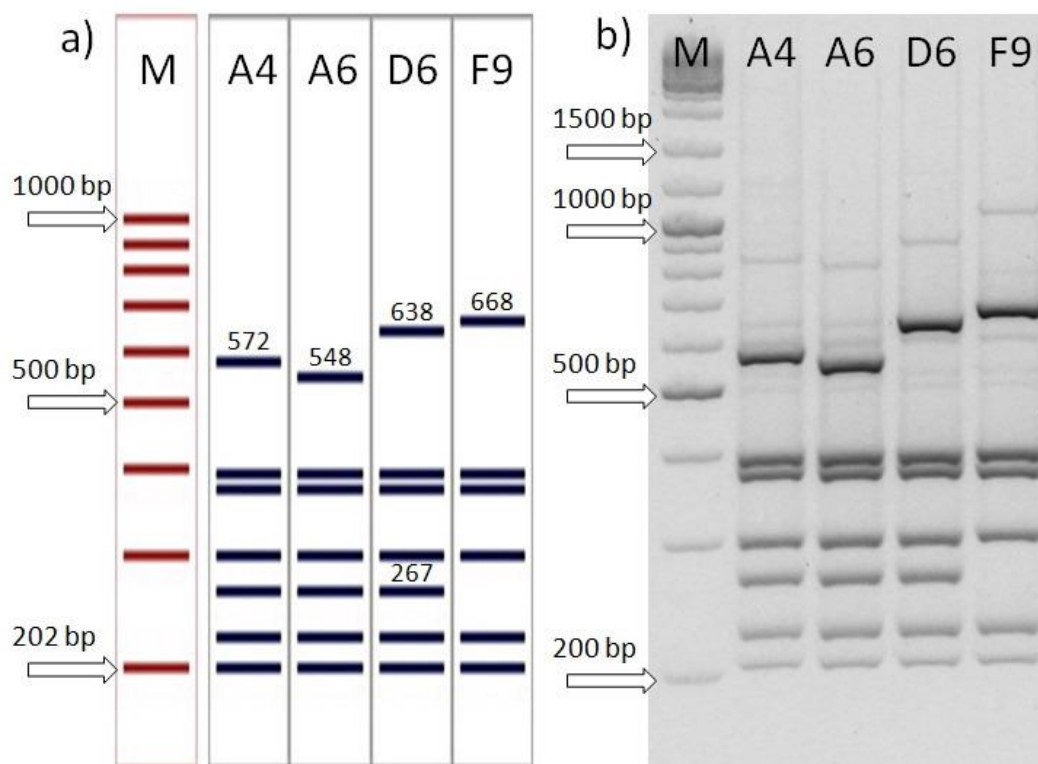


Obrázek 24: Příklad elektroforézy jednotlivých zaklonovaných variant BRCA1 s vysokým rozlišením. ASV BRCA1 Pocházejí z buněčné linie MCF-7. **M** – velikostní standard (marker).

Na základě separace s vysokým rozlišením jsme byli schopni přibližně určit délky jednotlivých ASV, což bylo následně využito při restričních mapování.

4.1.6 Identifikace sestřihových variant pomocí restriční analýzy

Pro inzerty reprezentující ASV BRCA1 (viz Tab. 6; Obr. 24) byly *in silico* zpracovány restriční mapy ampliconů po restrikci s *AcuI*. Na základě této analýzy jsme vypracovali virtuální elektroforézy pomocí programu Virtual Electrophoresis (Elchrom Scientific; <http://www.elchrom.com>; Obr. 25a). Poté jsme přistoupili k restrikci s *AcuI*. Následná elektroforetická separace restričních fragmentů probíhala na gelu s vysokým rozlišením (v rozmezí 100 – 1000 bp; Obr. 25b).



Obrázek 25: Porovnání **a)** virtuálně zpracované restrikce s vyznačenými velikostmi rozdílných fragmentů (v bp nad příslušným fragmentem) s **b)** výsledkem elektroforézy reálné restrikce jednotlivých ASV BRCA1 exprimovaných v buněčné linii MCF-7. **M** značí velikostní standard (marker). Z obrázku je patrný podobný profil fragmentů ve virtuální a skutečné elektroforéze.

Na základě této analýzy jsme byli schopni identifikovat a potvrdit přítomnost restričních fragmentů o specifické velikosti, které umožňují identifikaci příslušné varianty i ve směsných

vzorcích získaných amplifikací z biologického materiálu obsahujícího řadu alternativních sestřihových variant BRCA1. Tato metoda nám výrazně usnadnila identifikaci vzorků s potenciálně odlišnými ASV BRCA1. Nebylo tedy nezbytné každou variantu sekvenovat v plné délce ampliconu, ale na základě rozdílů ve velikostech jednotlivých restrikčních fragmentů jsme byli schopni identifikovat oblast s inzercí/deleci, která byla následně sekvenována.

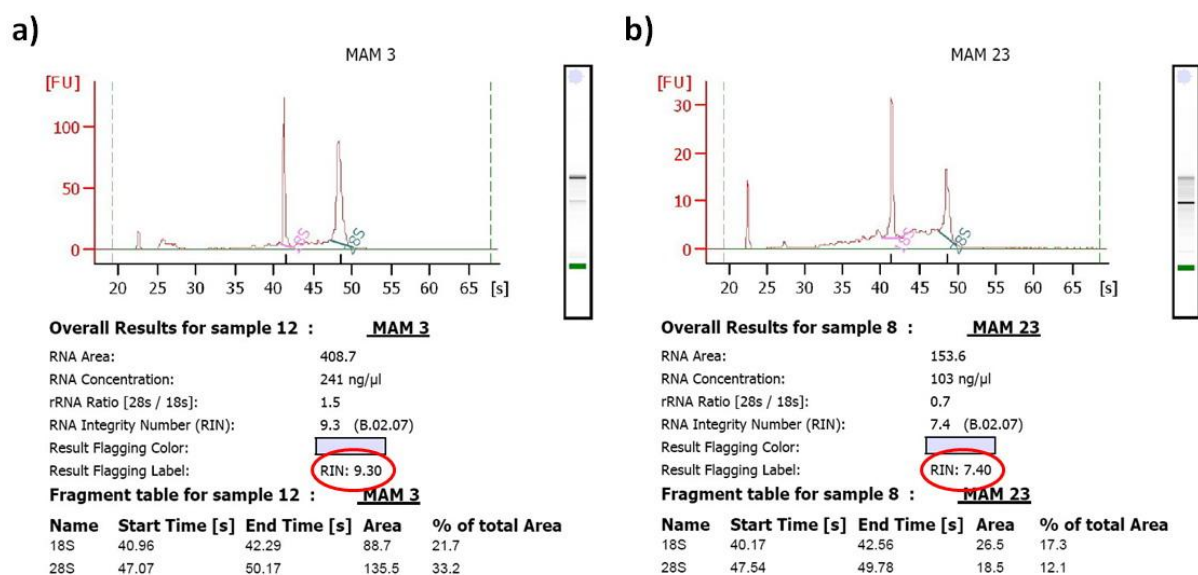
4.2 Identifikace sestřihových variant BRCA1 v biologických vzorcích

4.2.1 Výsledky izolace RNA

Celková RNA ze vzorků periferní krve byla úspěšně izolována od všech 58 žen zařazených do studie. U 20 z nich jsme provedli izolaci celkové RNA také z bioptované mamární a přilehlé tukové tkáně.

Průměrná hodnota koncentrace celkové RNA izolované z 2,5 ml krve a eluované 100 μ l ddH₂O byla 114,42 ng/ μ l (medián 108,03), průměrná hodnota koncentrace celkové RNA izolované z tkání eluované do 40 μ l byla 102,85 ng/ μ l (medián 88,98). Průměrná hodnota RIN celkové RNA u vzorků izolovaných z krve byla 7,33 (medián 7,55) a u tkání 6,17 (medián 6,2). V jednom případě byla RNA získaná z mamární tkáně vyřazena pro její nedostatečnou kvalitu a z důvodu nedostatku bioptovaného materiálu nebylo možno izolaci opakovat.

Nejlepší integrity celkové RNA bylo dosaženo okamžitým zpracováním čerstvých krevních vzorků, které však z důvodu odběrů na různých pracovištích nemohlo být praktikováno, proto byly zavedeny jednotné standardní postupy odběrů biologických vzorků pro účely izolace celkové RNA do RNA-prezervačních médií (Obr. 26).

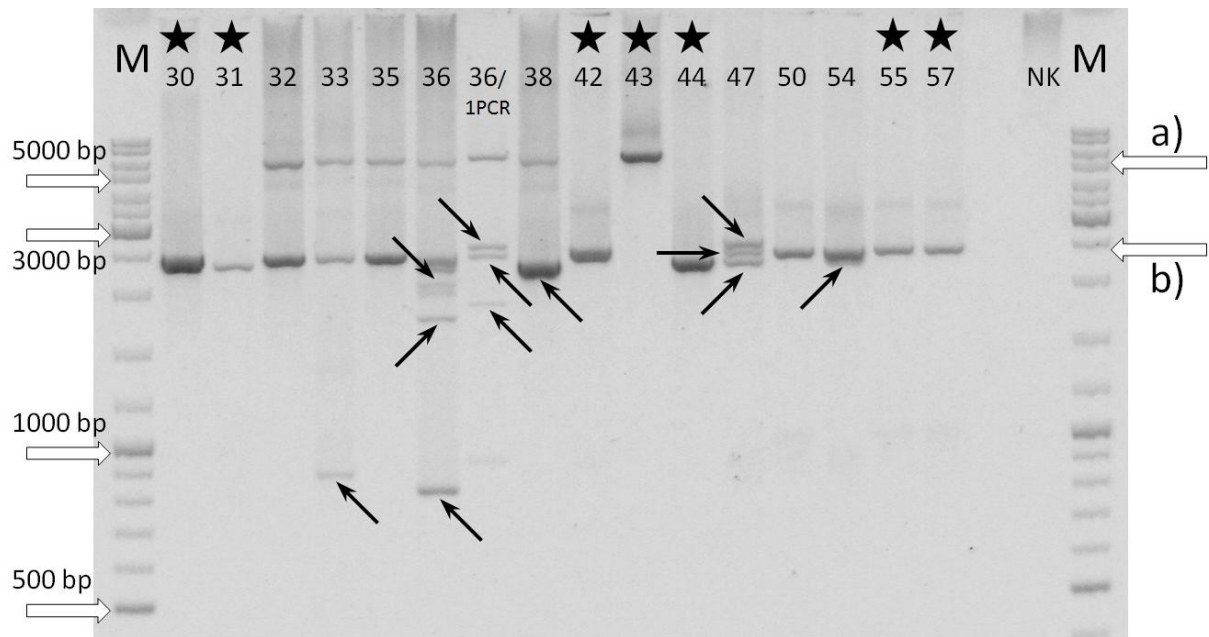


Obrázek 26: porovnání integrity RNA z **a)** čerstvě izolované krve **b)** z průměrného vzorku odebraného a mraženého ve zkumavce systému PaXGene Blood RNA (PreAnalytiX). Na elektroforeogramech je vidět **fialově** vyznačený obsah plochy píku 18S podjednotky rRNA a **zeleně** vyznačený obsah plochy píku 28S podjednotky. **Červeně** je vyznačeno výsledné číslo RIN charakterizující integritu RNA. Z grafu je patrný vyšší poměr obsahu 18S/28S podjednotek oproti celkovému obsahu RNA (obsah ploch 18S a 28S podjednotek oproti celkovému obsahu plochy pod křivkou) u vzorku MAM 3 než u vzorku MAM 23.

4.2.2 Identifikace sestříhových variant BRCA1 exprimovaných v leukocytech

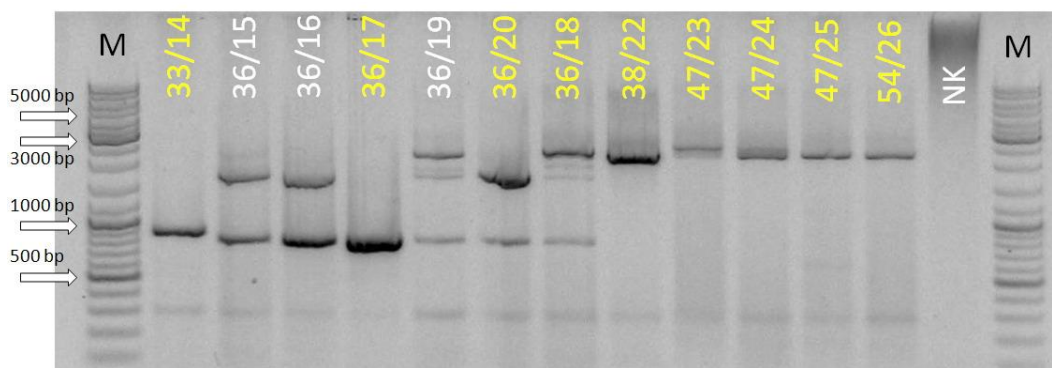
Cílem amplifikace ASV BRCA1 mRNA exprimovaných v leukocytech periferní krve bylo identifikace spektra sestříhových variant BRCA1 vyskytujících se ve vyšetřovaném souboru žen, tedy pacientek s karcinomem prsu v osobní anamnéze a v souboru zdravých kontrol, nikoliv detailní popis výskytu všech ASV vyskytujících se u každé jednotlivé probandky.

Po izolaci a charakterizaci celkové RNA získané z periferní krve jsme reverzní transkripcí s oligo-dT nasynthetizovali cDNA, kterou jsme poté amplifikovali ve dvou krocích pomocí semi-nested PCR. Produkty 2. PCR byly vizualizovány pomocí elektroforézy. U 35 z 58 vyšetřovaných vzorků byly nalezeny amplikony o velikosti nad 2000 bp. Tyto vzorky byly následně analyzovány na elektroforéze s vysokou rozlišovací schopností pro rozmezí 1000 – 7000 bp (Obr. 27) pro identifikaci a dostatečnou separaci amplikonů vznikajících z jednotlivých ASV BRCA1.



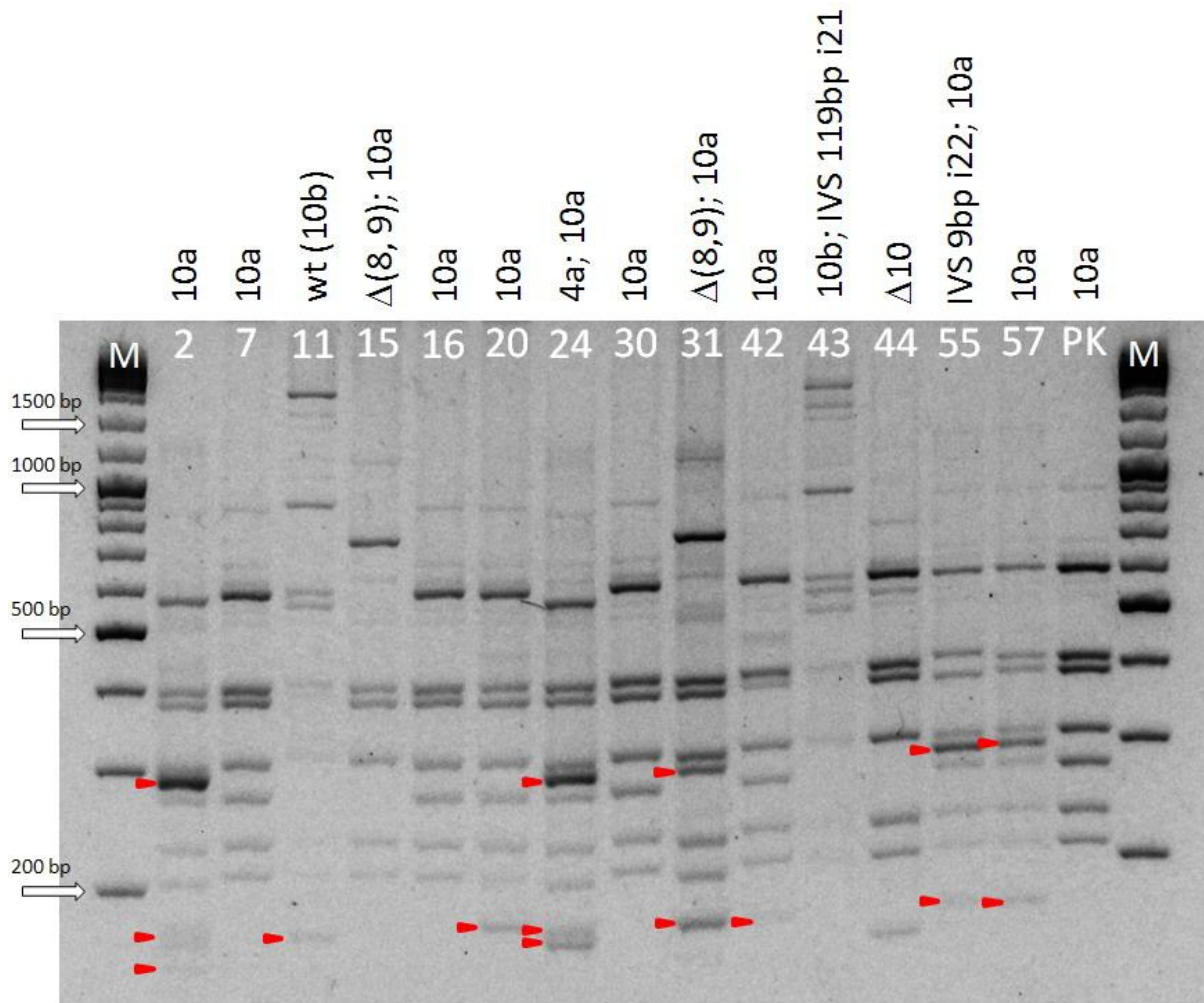
Obrázek 27: Analýza amplifikovaných ASV BRCA1 vybraných vzorků na elektroforéze s vysokou rozlišovací schopností. **Bílé šipky a)** označují pozici amplikonů wt BRCA1 a **b)** BRCA1a. **Černými hvězdičkami** jsou označeny vzorky, které jsme dále analyzovali pomocí restrikčního mapování. **Černými šipkami** jsou označeny amplikony, které byly vyříznuty z gelu a reamplifikovány. **M** - velikostní standard (marker). **NK** - negativní kontrola. Na elektroforézu byl pro kontrolu nanesen vzorek 36 po první amplifikaci označen 36/1PCR. Z obrázku je patrné, že po druhé amplifikaci jsme schopni detekovat varianty, které se ve vzorku vyskytují v mnohonásobně nižších koncentracích. Velikostní posun vzorků 36 a 36/1PCR je způsoben použitím odlišných primerů s rozdílem 97 bp.

Na základě této elektroforézy jsme byli schopni detekovat množství amplikonů a dále rozhodnout, zda budeme jednotlivé unikátní amplikony izolovat z gelu a reamplifikovat (u vzorků s vyšším počtem amplikonů; Obr. 28), nebo zda přímo použijeme metodu restrikčního mapování. K další analýze jsme vybrali amplikony s odlišnou velikostí.



Obrázek 28: Příklad kontrolní elektroforézy reamplifikovaných amplikonů. Čísla před lomítkem značí vzorek, ze kterého byl jednotlivý amplikon izolován, čísla za lomítkem jsou pořadová pro rozlišení amplikonů. **M** - velikostní standard (marker). **NK** - negativní kontrola. **Žlutě** označeny vzorky, které se dále charakterizovali restrikčním mapováním a sekvenováním. **Bíle** označeny vzorky, které jsme neanalyzovali, protože obsahovaly více dominantních amplikonů (36/15, 36/16, 36/19).

Vzorky, které obsahovaly jeden dominantní amplicon jsme přímo analyzovali pomocí restrikčního mapování (Obr. 29).

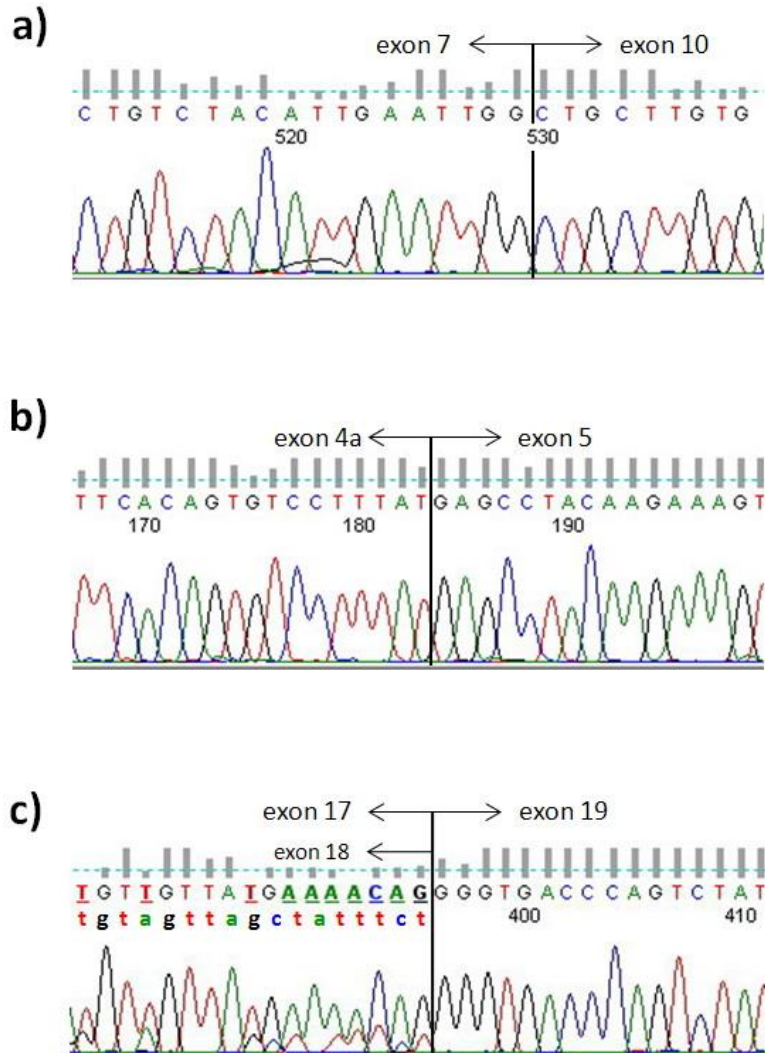


Obrázek 29: Příklad elektroforézy fragmentů vzniklých štěpením *AcuI* z ampliconů ASV BRCA1. Nad čísly vzorků jsou vypsány alternativní exony, výpadky či inserce jednotlivých ASV BRCA1. **PK** je označena pozitivní kontrola BRCA1a s krátkým exonem 10a. **Červenými značkami** jsou vyznačeny PCR amplifikace velmi rozsáhlých výpadků BRCA1 (viz Obr. 23), **M** jsou vyznačeny velikostní standardy (markery).

U vzorků 15 a 31 vidíme profil fragmentů s alternativním exonem 10a a výpadkem exonů 8 a 9. Vzhledem k restrikčnímu místu v exonu 8, který chybí, se tento profil vyznačuje chybějícím fragmentem o velikosti 267 bp a změnou velikosti prvního fragmentu z 572 na 716 bp. U vzorku 24 můžeme vidět posun prvního fragmentu, který po analýze odhalil alternativní exon 4a, který se od 4b liší výpadkem posledních 22 bp z exonu. U vzorku 44 má fragment o původní velikosti 267 bp velikost 150 bp, což odpovídá výpadku celého exonu 10 a navíc vzorek minoritně obsahuje alternativní exon 4a. Vzorek 43 obsahuje inserci 119 bp z intronu 11 a vzorek 55 inserci 9 bp z intronu 22. Ostatní vzorky vykazují profil varianty BRCA1 s alternativním exonem 10a a vzorek 11 vykazuje profil wt formy BRCA1.

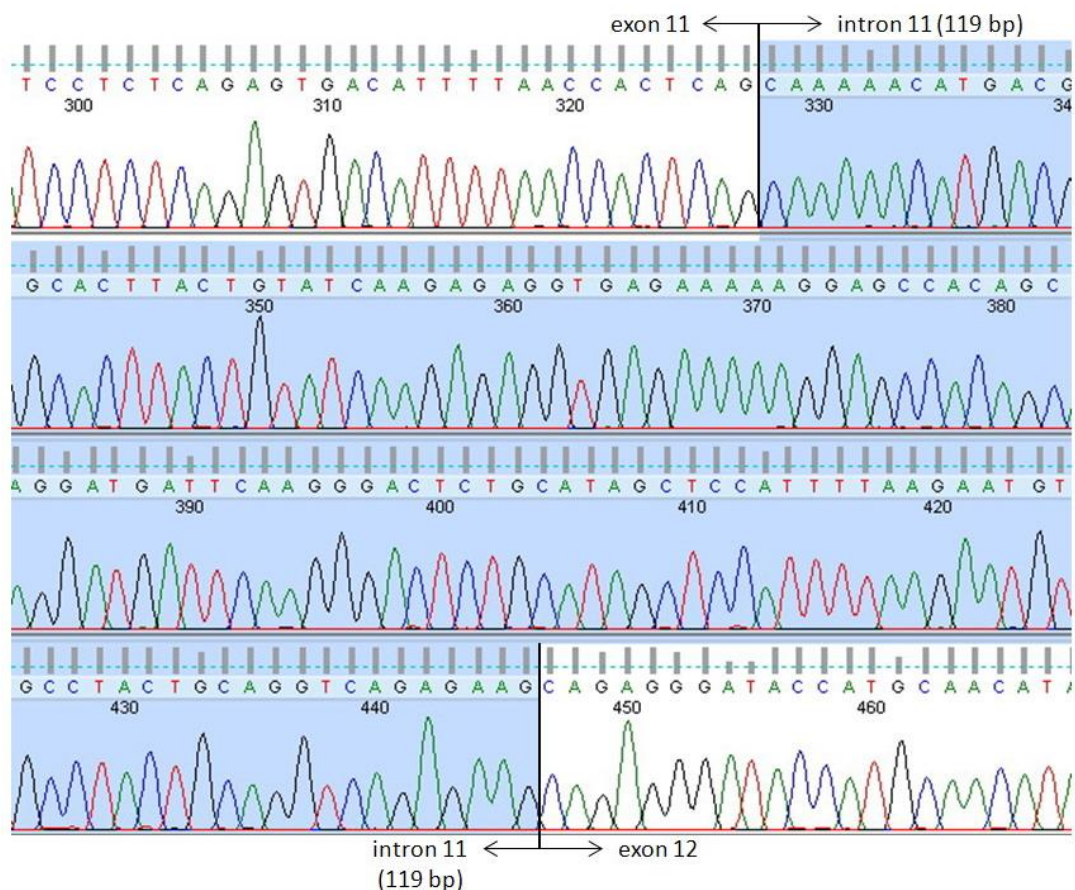
Na základě restrikčního mapování jsme byli schopni určit, v jaké části sekvence BRCA1 se vyskytují rozdíly a tuto část jsme se specifickými primery sekvenovali.

Sekvenování byl poslední krok identifikace jednotlivých sestříhových variant. Postupně byla identifikována řada výpadků (Obr. 30), respektive sestříhových variant (Obr. 32).



Obrázek 30: Příklad identifikovaných výpadků v sekvenci mRNA BRCA1 **a)** ASV BRCA1 Δ 8-9 **b)** ASV BRCA1 s alternativním exonem 4a (výpadek posledních 22 bp z exonu 4b; způsobuje posun ve čtecím rámci), **c)** sestříhová varianta BRCA1 Δ 18 - pod dominantní sekvencí exonu 17 je vidět slabá sekvence exonu 18 označenou malými písmeny. Černou šipkou je vyznačeno rozmezí exonů.

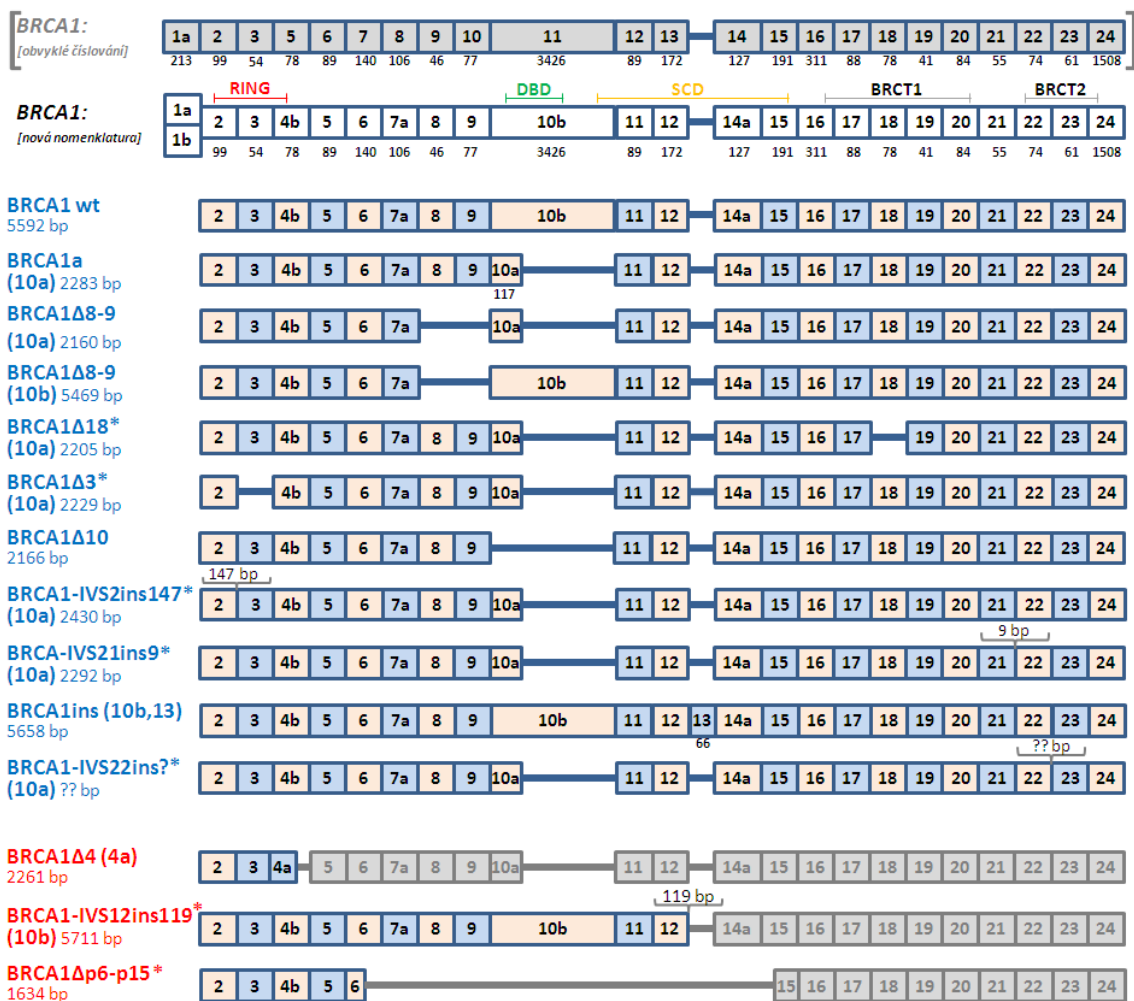
Ve vzorcích jsme identifikovali i několik variant nesoucích části intronových sekvencí (Obr. 31).



Obrázek 31: Příklad ASV BRCA1 s inzercí intronové sekvence o velikosti 119 bp (vyznačena modře). Černou šipkou je vyznačeno rozmezí exonů 11, 12 a intronové sekvence. Tato varianta způsobuje posun ve čtecím rámci.

Celkem bylo analyzováno 35 vzorků periferní krve ze souboru žen s karcinomem prsu a zdravých kontrol. V těchto vzorcích byly nalezeny sestřihové varianty shrnuté v obrázku 32. Celkem se nám podařilo ve vzorcích periferní krve plně identifikovat 14 ASV BRCA1.

Identifikace ASV BRCA1 ve vzorcích periferní krve použitými metodami odhalila přítomnost ampliconů obsahujících dlouhou variantu exonu 10 (10b) pouze u 11 z 58 vyšetřovaných žen. Tento průběžný výsledek překvapivě naznačoval, že exprese BRCA1 wt mRNA se vyskytuje v leukocytech periferní krve u přibližně 19 % žen vyšetřovaného souboru. Mezi nimi byly zastoupeny jak pacientky s karcinomem prsu tak ženy z kontrolního souboru. Podobně, nepřítomnost BRCA1 wt mRNA byla pozorována v obou vyšetřovaných souborech a nebyla tak diskriminačním faktorem odlišující ženy s karcinomem prsu a ženy bez přítomnosti nádoru.



Obrázek. 32: Přehled ASV BRCA1 identifikovaných v RNA izolované z leukocytů periferní krve. **Tmavě šedě** je vyznačena BRCA1 podle starého číslování exonů. **Bíle** je vyznačena BRCA1 dle nového číslování s barevně vyznačenými úseky kódujícími domény viz obrázek 4. **Modře** jsou vyznačeny varianty zachovávající čtecí rámec. **Červeně** jsou vyznačeny varianty, které čtecí rámec porušují. **Hvězdička** u názvu značí nově popsanou variantu.

Pozn.: 10a je zkrácená varianta exonu 10b o posledních 3309 bp, 4a je zkrácená varianta exonu 4b o posledních 22 bp. Sestříhovou variantu BRCA1-IVS22ins? nelze plně identifikovat z důvodu několika poly-A homopolymerů (A>14) obsažených ve vložené intronové sekvenci. U této varianty tedy nelze vyhodnotit čtecí rámec.

Pro kvantifikaci ASV ve tkáních a určení tkáňové specifčnosti u vzorků periferní krve, mamární tkáň a přilehlé tukové tkáň jsme vybrali varianty, které byly už dříve identifikované a popsané v literatuře [BRCA1 wt, BRCA1a (10a), BRCA1Δ8-9+e10b; BRCA1b Δ8-9,10b a BRCA1 Δ3] a dále variantu BRCA1 Δ18, která dosud popsaná nebyla, a která se vyznačuje výpadkem exonu kódující část první BRCT domény a zachovávající čtecí rámec (Obr. 4).

4.3 Kvantifikace sestřihových variant BRCA1 v biologických vzorcích

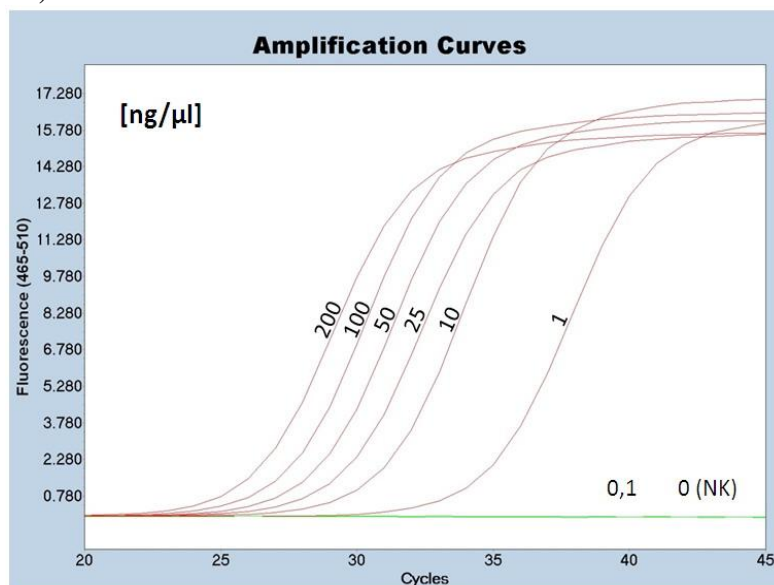
4.3.1 Stanovení efektivity qPCR a detekčního rozmezí metody

Efektivity jednotlivých optimalizovaných typů qPCR (Obr. 33a) byly v programu REST spočítány na podkladě kalibračních křivek (Obr. 33b) zkontruovaných dilucí cDNA v rozmezí 200 – 0,1 ng celkové RNA (resp. cDNA) vložených do reakce. Toto rozmezí koncentrace cDNA použité pro kalibraci bylo navrženo tak, aby koncentrace námi standardně syntetizovaných cDNA pro qPCR (50 ng/μl) byly ve střední oblasti kalibrační křivky. Sledované amplicony pokrývající ASV BRCA1 byly při množství templátové RNA 0,1 ng/reakce již mimo detekční možnosti použité metody a neamplifikovaly se.

a)

Gen	Ef [%]
BRCA1: e24	95,0
BRCA1: e10a	99,2
BRCA1: e10b	99,8
BRCA1: Δ8-9(10a)	99,1
BRCA1: Δ8-9(10b)	98,5
BRCA1: Δ3	94,8
BRCA1: Δ18	97,1
UBC	97,4

b)

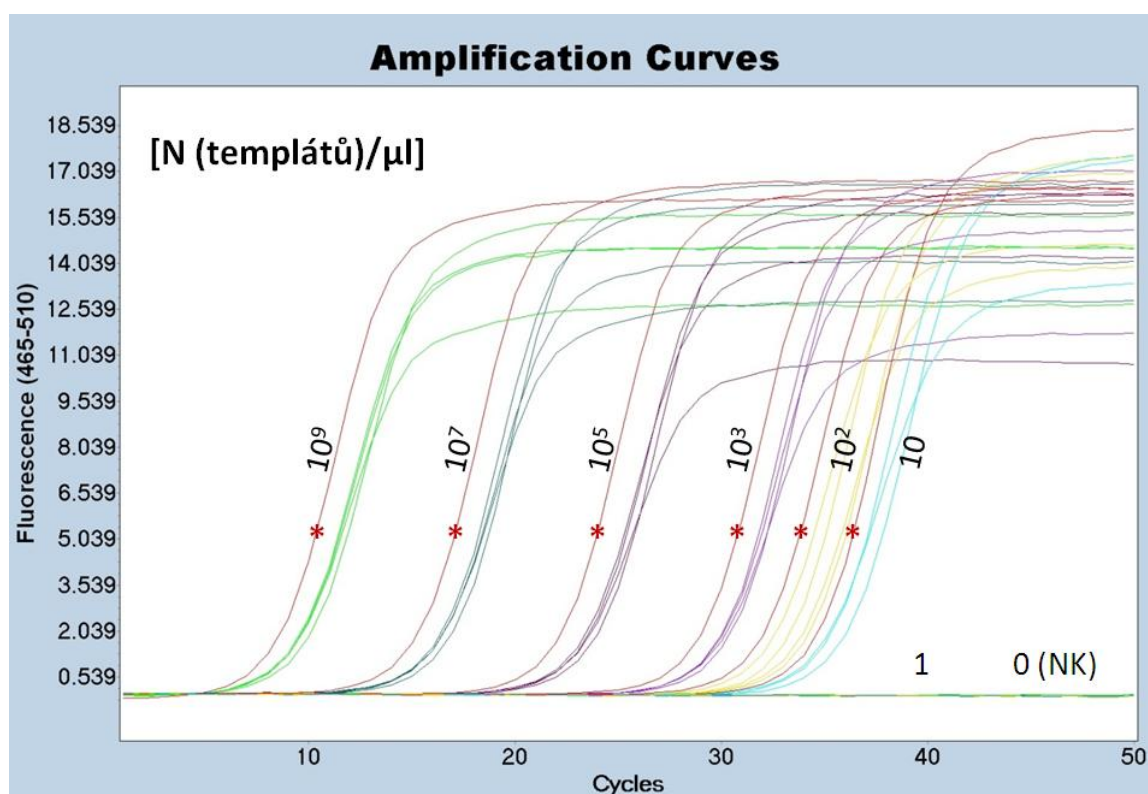


Obrázek 33: a) Tabulka efektivit jednotlivých optimalizovaných ampliconů. b) Příklad křivek qPCR z různých množství cDNA (resp. RNA) vstupujících do reakce při konstrukci kalibrační křivky. Přístroj: LightCycler 480 (Roche)

Paralelně s konstrukcí kalibračních křivek vzniklých dilucí cDNA byly pro sledované amplicony zkonstruovány i kalibrační křivky pro absolutní kvantifikaci (Obr. 34). Tyto kalibrační řady nebyly primárně určeny pro absolutní kvantifikaci sledovaných sestřihových

variant, ale byly provedeny k možnosti posouzení přítomnosti / nepřítomnosti vyšší afinity některých párů primerů ke svému templátu, neboť v tomto projektu bylo nutno porovnávat mezi sebou míru exprese jednotlivých typů ASV, ne pouze sledovat dynamiku změn relativní exprese určité ASV mezi jednotlivými sledovanými skupinami.

Dvojnásobné „zvýšení“ míry exprese ampliconu odpovídajícího expresi varianty BRCA1a (obsahující krátký exon 10a) nebylo způsobeno jeho snadnější amplifikací, ale dvojnásobným množstvím templátu pro tento úsek ve směsném roztoku sloužícím pro přípravu dilučních řad. Část sekvence ampliconu určeného k identifikaci sestřihové varianty $\Delta 8-9$ v kombinaci s krátkým exonem 10 [$\Delta 8-9$ (10a)], totiž obsahuje sekvenci identickou s ampliconem BRCA1a (viz Obr. 17).

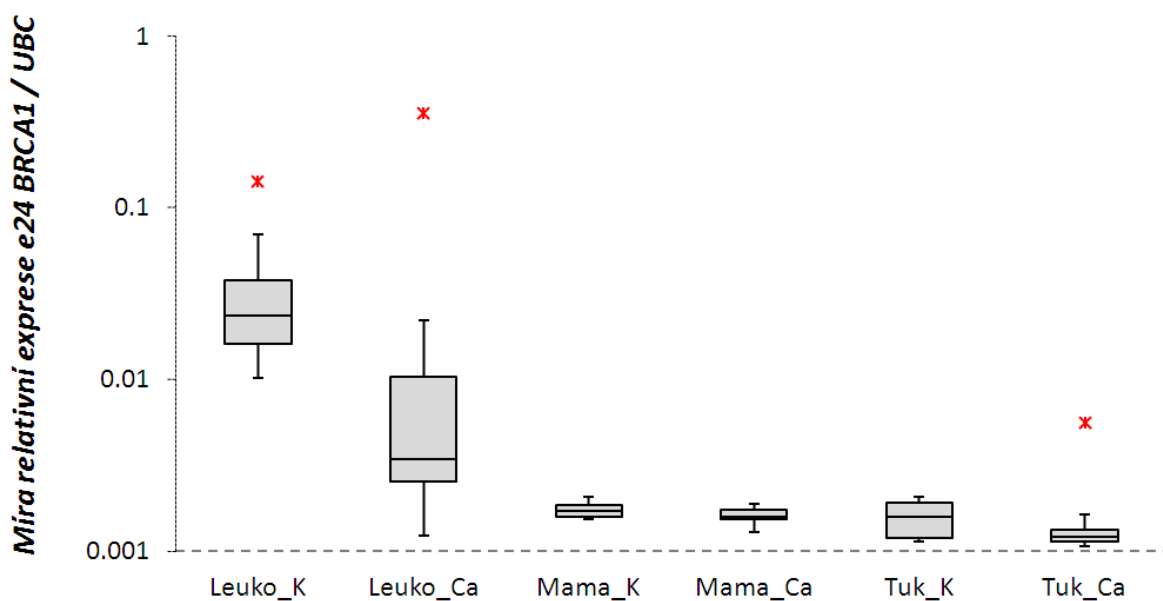


Obrázek 34: Absolutní kalibrační křivka vybraných ASV BRCA1. Barevně jsou rozlišena jednotlivá ředění (množství každého ampliconu v reakci). * značí amplicon 10a, který při kalibraci překračoval detekční limit fluorescence (Cp – crossing point) v případě všech použitých koncentrací templátů o cca 1 cyklus proti ostatním stejně koncentrovaným templátům (viz text výše). Ředění 10^2 a 10 se dostává na hranici detekčního limitu metody, jak je patrné z vyššího rozptylu Cp. V této oblasti se již projevují mírné rozdíly v efektivitách amplifikací jednotlivých ampliconů.

Konstrukce ředících řad se známými vstupními koncentracemi specifických templátů našeho zájmu ukázala, že efektivita stanovená tímto způsobem se neodlišovala od efektivitu qPCR určené pomocí ředících řad cDNA templátů. Maximální pozorovaná odlišnost byla < 0,5 % účinnosti. Možná přítomnost inhibičních faktorů limitujících účinnost qPCR v roztoku templátové cDNA má tedy při dodržení postupu přípravy vzorků a provádění qPCR minimální vliv na vlastní průběh reakce.

4.3.2 Expese vybraných ASV BRCA1 ve vzorcích tkání

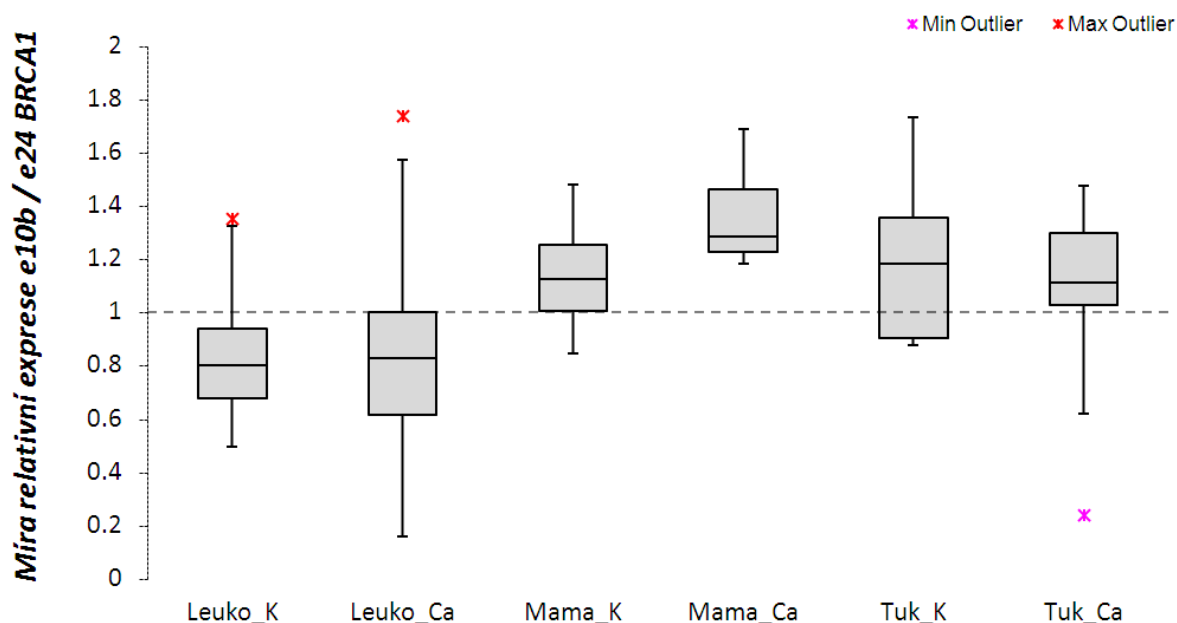
Genová exprese všech forem BRCA1 mRNA je ve sledovaných tkáních relativně nízká, řádově v množství 10^{-3} násobku množství mRNA UBC (Obr. 35). Mezi expresí souborů žen s / bez nádoru nejsou statisticky významné rozdíly.



Obrázek 35: Poměr genové exprese BRCA1 mRNA (vyjádřeno mírou exprese exonu 24 BRCA1) vůči expresi mRNA referenčního genu UBC (míra jeho exprese v grafu ~ 1) ve sledovaných skupinách (**K** – kontroly, **Ca** – ženy s Ca prsu v osobní anamnéze) a typech tkání (RNA izolovaná z: **Leuko** - leukocytů periferní žilní krve; **Mama** – nenádorové mamární tkáně; **Tuk** – perimamární tukové tkáně). * - odlehlé hodnoty.

Vzhledem k relativně nízké expresi mRNA BRCA1 byla (s ohledem na detekční limit metody) zvolena hranice relativního zastoupení dané ASV ve všech BRCA1 mRNA >1 %.

ASV obsahující dlouhý exon 10 (10b) byla identifikována ve všech vyšetřovaných vzorcích RNA (resp. cDNA). Tato ASV byla dominantní i do míry genové exprese (při relativní kvantifikaci exprese ASV obsahující exon 10b (e10b) vůči expresi exonu 24 (e24) BRCA1) bez ohledu na přítomnost / nepřítomnost karcinomu prsu v osobní anamnéze a typ vyšetřované tkáně (Obr. 36).



Obrázek 36: Poměr genové exprese e10b vůči expresi e24 BRCA1 mRNA (míra jeho exprese v grafu ~ 1) ve sledovaných skupinách (**K** – kontroly, **Ca** – ženy s Ca prsu v osobní anamnéze) a typech tkání (RNA izolovaná z: **Leuko** - leukocytů periferní žilní krve; **Mama** – nenádorové mamární tkáně; **Tuk** – perimamární tukové tkáně).

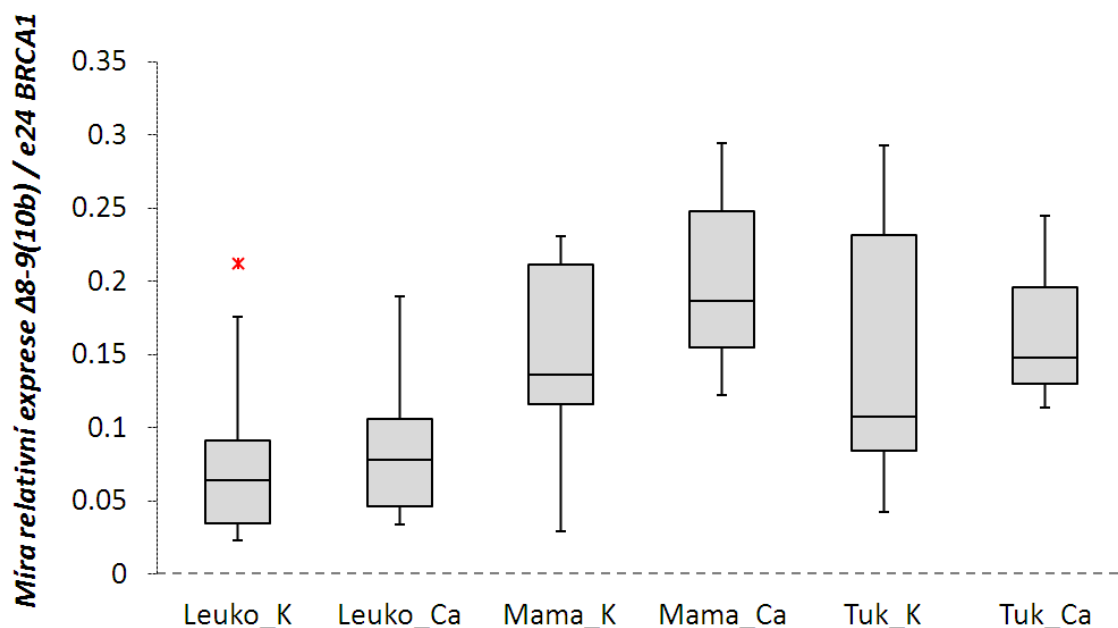
Vyšší relativní exprese variant s exonem 10b ve srovnání s variantami s exonem 24 může být způsobena přítomností ASV varianty BRCA1 IRIS, která obsahuje alternativní 3'UTR a nebyla tudíž v našem systému zachycena.

Četnosti výskytu ostatních sledovaných ASV BRCA1 ve vyšetřovaných souborech a typech tkání jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7: Četnost výskytu sledovaných ASV BRCA1 ve vyšetřovaných souborech a typech tkání.

	Leuko_K (N = 28) [N (%)]	Leuko_Ca (N = 30) [N (%)]	Mama_K (N = 9) [N (%)]	Mama_Ca (N = 10) [N (%)]	Tuk_K (N = 9) [N (%)]	Tuk_Ca (N = 10) [N (%)]	MCF-7 (N = 1)
BRCA1: e10a	28 (100)	27 (90)	9 (100)	10 (100)	9 (100)	10 (100)	1
BRCA1: Δ8-9(10a)	11 (39)	15 (50)	7 (78)	8 (80)	6 (66)	7 (70)	1
BRCA1: Δ8-9(10b)	27 (96)	26 (87)	9 (100)	9 (90)	9 (100)	10 (100)	1
BRCA1: Δ3	14 (50)	11 (37)	5 (56)	5 (50)	4 (44)	3 (30)	1
BRCA1: Δ18	0	1 (3)	0	0	0	0	0

Ze spektra vyšetřovaných ASV byla nejvíce exprimovanou BRCA1 Δ 8-9 (10b), která tvořila 6,4 – 18,6 % wt BRCA1 mRNA (Obr. 37). V expresi nebyly pozorovány významné rozdíly mezi souborem pacientek s karcinomem prsu a zdravými kontrolami. Zastoupení ASV Δ 8-9 (10b) mezi všemi mRNA BRCA1 se jeví být vyšší ve vyšetřovaných tkáních než v leukocytech, rozdíly však nejsou na dosud vyšetřeném souboru statisticky signifikantní.



Obrázek 37: Poměr genové exprese Δ 8-9 (10b) vůči expresi e24 BRCA1 mRNA (míra jeho exprese v grafu ~ 1) ve sledovaných skupinách (**K** – kontroly, **Ca** – ženy s Ca prsu v osobní anamnéze) a typech tkání (RNA izolovaná z: **Leuko** - leukocytů periferní žilní krve; **Mama** – nenádorové mamární tkáně; **Tuk** – perimamární tukové tkáně). * - odlehlé hodnoty.

ASV BRCA1a (obsahující krátký exon 10a) se ve vyšetřovaných vzorcích exprimovala v průměru více než 11x méně, než varianta obsahující dlouhý exon 11b.

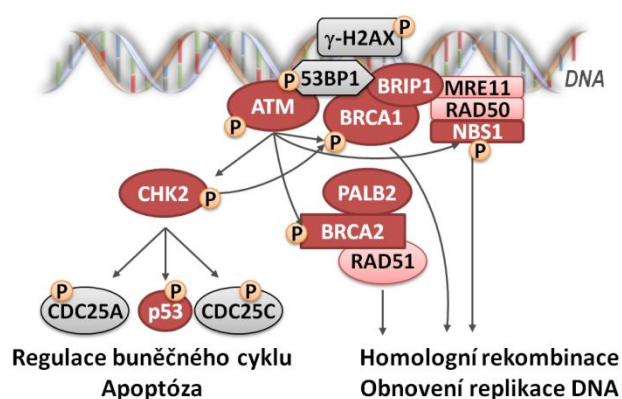
ASV BRCA1 Δ 8-9 (10a) tvořila ve vzorcích, ve kterých se exprimovala, 3,6 % všech přítomných mRNA BRCA1 (střední hodnota 0,0356; chyba střední hodnoty 0,0033), a to ve všech vyšetřovaných typech tkání a analyzovaných skupinách.

Expresce BRCA1 Δ 3 byla u uvedeného počtu žen (Tab. 7) exprimována na hranici detekčního limitu metody, tvořila 1,1 – 1,4 % BRCA1 mRNA.

Expresce BRCA1 Δ 18 byla nalezena pouze u jednoho vzorku RNA izolované z periferní krve, kde expresce této varianty vykazovala překvapivě v nezávislých doubletech téměř 50 % exprese wt BRCA1 mRNA.

5 DISKUZE

Karcinom prsu je nejčastějším onkologickým onemocněním v populaci žen v České republice. Vyskytuje se ve dvou patogeneticky rozdílných formách. U většiny žen se karcinom prsu vyvíjí ve formě sporadického onemocnění, které vzniká v důsledku akumulace somatických mutací v buňkách prsní žlázy. U dědičných forem karcinomu prsu, tvořících 5-10 % mamárních tumorů je proces nádorové transformace výrazně pravděpodobnější v důsledku existence patogenní mutace v některém z predispozičních genů kódujících některý z proteinů zúčastněných v (pravděpodobně tkáňově specifickém) procesu nádorové supresivity. Do současné doby bylo charakterizováno několik predispozičních genů, jejichž patogenní alterace významně zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu (*BRCA1* a *BRCA2*, *p53*, *PTEN*, *LKB1/STK11*; Oldenburg et al., 2007). Další geny ovlivňující riziko vzniku karcinomu prsu v podstatně menší míře (geny s nízkou a střední penetrancí), tvoří rozrůstající se pestrou skupinu genů [*ATM*, *CHEK2*, *NBS1 (NBN)*, *PALB2*, *TGFβ1*, *CASP-8*, a další]. Až nápadným, ve výčtu genů podílejících se na vzniku hereditárních forem karcinomu prsu, je jejich blízký vztah k pochodům přímo zprostředkujícím nebo regulujícím reparaci genomové DNA (Obr. 38; Bartkova et al., 2008). DNA reparační mechanismy pravděpodobně tvoří kritickou bariéru zabraňující nádorové transformaci (Bartek et al. 2007). Jejich selhání je tak obvyklým příznakem tumorogeneze.



Obrázek 38: Poruchy řady genů kódujících proteiny reparace dvouřetězcových zlomů v DNA vykazují přímý vliv na patogenezi hereditárních i sporadických forem karcinomu prsu (červeně), počínaje senzorkými proteiny (*ATM*) a proteiny MRN komplexu, přenašeči signálu (*CHK2*) i výkonnými molekulami regulujícími vlastní reparační pochody (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *RAD51*), kontrolní body buněčného cyklu (*CDC25A* a *C*) nebo aktivaci apoptózy (*p53*). Upraveno dle Bartkova et al., 2008.

Gen *BRCA1* je hlavním predispozičním faktorem vzniku dědičné formy karcinomu prsu a ovaria v České Republice (Pohlreich et al., 2005; Foretová et al., 2011). Riziko vzniku

karcinomu prsu u nosiček mutací v genu *BRCA1* je vysoké. Celoživotní riziko onemocnění dosahuje přibližně 80 %. Nosičky mutací v genu *BRCA1* tvoří více než 2 % ze všech pacientek s karcinomem prsu v ČR (Mateju et al., 2010). Identifikace nosičů patogenních mutací genu *BRCA1* je důležitým cílem klinické onkogenetiky. Umožňuje zařazení onkologických pacientů do specializovaných programů pro časnou diagnostiku případného vzniku metachronního nádorového onemocnění či aplikaci specializovaných léčebných modalit (např. inhibitory PARP1). U klinicky asymptomatických jedinců v rodinách nosičů mutací umožňuje diferencovat preventivní programy na základě přítomnosti či nepřítomnosti příčinné mutace.

Gen *BRCA1* kóduje protein s integrující funkcí v reparaci dvouřetězcových zlomů DNA, které reprezentují skupinu nejzávažnějších poruch genomu. Protein *BRCA1* v reparačních pochodech vystupuje jako interakční partner řady proteinů (viz Úvod), se kterými specificky interaguje prostřednictvím svých konzervativních proteinových domén. Kódující sekvence pro tyto domény se objevuje v jednotlivých exonech genu *BRCA1* (Obr. 4). Kromě proteinu obsahujícího 22 kódujících exonů byla popsána řada alternativních sestřihových variant (ASV) *BRCA1* mRNA (Tab. 1). Význam těchto variant je převážně nejasný, i když je známo, že mutace v konsenzních sestřihových sekvencích genu *BRCA1*, které vedou k aberantnímu sestřihu *BRCA1* mRNA, mají prokazatelně patogenní účinek (Thomassen et al., 2012). V současné době tak máme řadu poznatků o aberantních sestřihových variantách, avšak systematické znalosti o mechanismu vzniku, funkci, významu, zastoupení, expresi či tkáňové specifitě sestřihových variant vznikajících alternativním sestřihem intaktní *BRCA1* pre-mRNA jsou nedostatečné. V rámci mutačních analýz zaměřených na detekci a charakterizaci mutací v genu *BRCA1* u rizikových pacientek jsme v naší laboratoři identifikovali řadu ASV *BRCA1* (Pohlreich et al., 2006). V experimentálním modelovém systému na liniích MCF-7 jsme prokázali, že některé sestřihové varianty (neporušující čtecí rámeček) vedoucí ke ztrátě nebo poruše důležitých funkčních domén (*BRCA1*Δ14-15 s poruchou struktury SCD a *BRCA1*Δ17-19 s delecí první BRCT domény) mohou dominantně negativním způsobem interferovat s wt *BRCA1* v její primární úloze – reparaci dvouřetězcových zlomů v DNA (Ševčík et al., 2010 a 2012).

Hlavním cílem této práce byla identifikace a charakterizace exprese ASV *BRCA1*. Nejprve jsme se zaměřili na vytvoření systému pro identifikaci těchto variant. Dominantní (wt) sestřihová forma *BRCA1* mRNA obsahující 22 exonů je charakterizována přítomností rozsáhlého exonu 10 (označovaného jako 10b). Tento exon reprezentuje 3309 bp, což tvoří

více než 60 % kódující sekvence wt BRCA1 mRNA. Jelikož jsme nemohli vyloučit, že ve vzorcích budou přítomny varianty se současnými výpadky krátkých exonů před i za rozsáhlou sekvencí exonu 10b, rozhodli jsme se pro identifikaci ASV BRCA1 v biologických vzorcích využít amplifikace generující amplicony z oblasti 5'-UTR do 3'-UTR mRNA. Kombinované sestřihy před a za sekvencí exonu 10b by nebylo možné charakterizovat jinými metodami, které by přicházeli do úvahy (next-gen transkriptomové sekvenování či amplifikace částí BRCA1 mRNA). Zvolená strategie však vyžadovala, aby vstupní RNA pro syntézu cDNA byla co nejméně poškozena a nutnost použití oligo-dT k syntéze cDNA. První experimenty provedené s cDNA připravené ze vzorků RNA izolované z leukocytů periferní krve však ukázaly, že při amplifikaci s primery z 5'-UTR do 3'-UTR mRNA nedochází k amplifikaci dlouhých forem BRCA1 mRNA, ale preferenčně vznikají krátké amplicony. Tyto jsme identifikovali, jako sestřihové varianty s rozsáhlými výpadky [$\Delta 2-19+\Delta 22$; $\Delta 2-17$; $\Delta 2-21+\text{insIVS21}+837_1001+\text{insIVS21}-776_588$] podstatné části kódující sekvence BRCA1 mRNA včetně obou iniciačních míst pro translaci proteinu (viz kapitola 4.1.4). Pravděpodobným důvodem špatné amplifikace dlouhých variant BRCA1 mRNA byla chyba metody, kdy:

- a) Syntéza z 5'-UTR do 3'-UTR z dlouhých forem BRCA1 mRNA (s fragmenty přesahující 5 kb) vyžadovala zcela intaktní mRNA. I přes dobrou kvalitu izolované celkové RNA lze předpokládat, že fragmentace dlouhých molekul mRNA bude pravděpodobnější.
- b) Při použití oligo-dT primeru (i přes robustní optimalizaci syntézy cDNA) se v případě dlouhých forem BRCA1 mRNA kompletní cDNA z poly-A ve 3'-UTR až do 5'-UTR pravděpodobně nesyntetizovala pouze ve velmi malém počtu molekul.²
- c) V kvantifikačních experimentech jsme zaznamenali, že množství transkriptu BRCA1 je velmi nízké, což zvyrazňuje negativní dopad předchozích dvou bodů.

Z těchto důvodů ve zvoleném systému docházelo k preferenční amplifikaci (jinak minoritně zastoupených) krátkých ASV BRCA1, jejichž mRNA nebyla fragmentována, přepis do cDNA probíhal s vyšší úspěšností a PCR amplifikace s vyšší efektivitou. Abychom odstranili

² Arteficiální obohacení cDNA syntetizované s oligo-dT primery o sekvence na 3'-UTR je dobře dokladovatelné například na výsledcích transkriptomového sekvenování s vysokým pokrytím (Nagalakshmi et al., Science 2008). Kromě předčasného uvolnění reverzní transkriptázy z templátového vlákna při syntéze dlouhých molekul cDNA dochází při použití oligo-dT primerů i k jejich nasedání na homopolymerní A sekvence způsobující syntézu neúplných fragmentů (Nam et al., 2002).

arteficiální kontaminaci těchto variant na úrovni PCR produktů, provedli jsme následné amplifikace s forward primerem posunutým z 5'-UTR do exonu 2, těsně za AUG iniciační kodon. Touto změnou jsme již dosáhli amplifikace dlouhých ASV BRCA1 včetně variant obsahujících exon 10b. Třebaže tyto varianty nebyly zachyceny ve všech vzorcích RNA z lymfocytů periferní krve, předpokládali jsme, že při analýze souboru 58 vzorků RNA budeme schopni charakterizovat všechny ASV BRCA1, které se vyskytují v transkriptomu leukocytů s četností větší, než je 1 %. Význam ASV BRCA1, které by se vyskytovaly s nižší četností je pravděpodobně zanedbatelný.

Celkem jsme identifikovali 14 různých variant BRCA1. U 10 ASV (včetně BRCA1 wt) zůstává zachován čtecí rámec (ORF). Nejvariantnějším exonem je exon 10, který se u šesti variant vyskytuje v podobě zkráceného exonu 10a. Exon 10a byl popsán v řadě prací (shrnuje v Orban a Olah, 2003; Tab. 1) a na rozdíl od dlouhé formy exonu 10b obsahuje pouze 117 bp, které kódují 39 prvních AK exonu 10b. Ztrátou 1103 AK přicházejí exprimované izoformy ASV BRCA1 s krátkým exonem 10a o oba NLS, oblast pro nespecifickou vazbu s DNA a část SCD obsahující nejméně tři důležitá místa fosforylace BRCA1 kinázami ATM/ATR (S1280, S1298 a S1330; Obr. 7). Výskyt ASV s alternativním exonem 10a byl popsán ve vzorcích z periferní krve i v buňkách buněčných linií (Lu et al., 1996; Wang et al., 1997; Orban a Olah, 2001). Význam těchto variant *in vivo* není znám. Na modelu buněčných linií z různých nádorových tkání bylo zjištěno (Yuli et al., 2007), že tyto varianty nemají negativní vliv na wt funkci proteinu BRCA1 jako tumor-supresoru. Nadto bylo prokázáno, že overexprese izoformy s exonem 10a se podílí na inhibici růstu u buněčných linií karcinomu prsu exprimujících estrogení receptor (ER) a triple-negativních (neexprimujících ER, progesteronový receptor (PR) a ErbB2) linií karcinomu prsu, kde zvyšuje citlivost studovaných linií na indukci apoptózy *in vitro* (Yuli et al., 2007). Je však třeba podotknout, že v citované práci byly izoformy s krátkou variantou exonu 10 (10a) pravděpodobně významně overexprimovány.

Další častá varianta zachycená ve vzorcích izolovaných z leukocytů periferní krve byla in-frame delece exonů 8 a 9, vyskytující se v kombinaci s dlouhou i krátkou variantou exonu 10 (10a i 10b). Delecí exonu 8 a 9 dochází k výpadku 123 AK. U overexprese variant BRCA1 Δ 8-9 byla popsána ektopická exprese proteinové izoformy BRCA1 do mitochondrie, avšak závěry této *in vitro* studie jsou vysoce spekulativní (Maniccia et al., 2009). V nedávné době byl popsán vliv tiché mutace c.591C>T (p.Cys197Cys) v genu *BRCA1* na vznik ASV s výpadkem exonu 8 a především exonů 8-9. Práce Dosil et al., 2010 ukazuje, že tato exonová

varianta významně mění poměr mezi wt BRCA1 mRNA a BRCA1 Δ 8-9 (zachovávající ORF; je zajímavé, že se významně nezvyšuje exprese posunové varianty BRCA1 Δ 8). V práci autoři uvádějí, že ve vzorcích nenosičů alterace c.591C>T se varianta BRCA1 Δ 8-9 vyskytuje v poměru přibližně 25 % k wt BRCA1 mRNA. Tomu odpovídají i naše výsledky, které ukazují, že zastoupení varianty BRCA1 Δ 8-9 je nejčastější ze všech analyzovaných ASV BRCA1 ve vyšetřovaných vzorcích, a v závislosti na typu analyzované tkáně se vyskytuje v 6,4 – 18,6 % ve srovnání s wt BRCA1 mRNA. Výpadek těchto exonů nemá pravděpodobně významný vliv na funkci proteinu BRCA1. Z výsledků mutačních analýz provedených v naší laboratoři vyplývá, že četnost varianty c.591C>T v ČR je pravděpodobně velmi nízká. Alterace byla zachycena u 1 z 980 analyzovaných pacientek (0,1 %).

U nově identifikované varianty BRCA1 Δ 3 s krátkou formou exonu 10 (10a) lze předpokládat, že (podobně jako u této sestříhové varianty s exonem 10b) bude docházet k translaci proteinu za využití alternativního iniciačního kodonu lokalizovaného v exonu 4. BRCA1 Δ 3 s dlouhou variantou exonu 10 (10b) je popsána, i když jinak necharakterizovanou, transkripční variantou BRCA1.

Expresa BRCA1 Δ 18 byla nalezena pouze u jednoho vzorku RNA izolované z periferní krve, kde exprese této varianty vykazovala téměř 50 % exprese wt BRCA1 mRNA. Vyšetření tkání u této pacientky s karcinomem prsu (v 31 letech) nebylo dosud provedeno. Pacientka z důvodu nízkého věku onemocnění splňuje kritéria pro provedení mutační analýzy *BRCA1/2* (Pohlreich et al., 2005), která byla dokončena až po provedení analýzy exprese BRCA1 Δ 18 qPCR. Mutační analýza překvapivě odhalila přítomnost pravděpodobně patogenní mutace v genu *BRCA1* IVS18+1G>A, která s vysokou pravděpodobností způsobuje námi nalezenou delecí exonu 18. V tomto případě se tak nejedná o alternativní, ale aberantní sestříhovou variantu BRCA1. Přítomnost mutace IVS18+1G>A v jedné z alel genu BRCA1 rovněž vysvětluje vysokou míru exprese této varianty při qPCR analýze, kdy exprese BRCA1 Δ 18 vykazovala při opakovaných vyšetřeních hodnoty 49 % z celkové exprese BRCA1 mRNA. Delecí exonu 18 dochází k výpadku 26 AK umístěných uprostřed první BRCT domény. Domníváme se, že vzniklý výpadek může mít u proteinového produktu dramaticky negativní vliv na protein-proteinové interakce BRCA1 a tím i funkci BRCA1 v reparaci DNA. Naše předchozí výsledky in vitro experimentů s variantou BRCA1 Δ 17-19 (s výpadkem 69 AK) ukazují, že ztráta první BRCT domény způsobuje poruchu sestavování reparačních ohnisek s účastí proteinu BRCA1 v buňkách linie MCF-7 a zároveň způsobuje jejich vysokou radiorezistenci na účinky γ -záření (Ševčík et al., 2010).

Nově jsme popsali variantu s inzercí 147 b z intronu 2. Třebaže tato varianta nezpůsobuje posun čtecího rámce, inserce intronové sekvence obsahuje celkem sedm tripletů kódujících stop kodon. Pokud tak není přítomnost této varianty regulována mechanismem non-sense mediated decay (NMD, což se jeví jako pravděpodobné; Scholzova et al. 2007), mohlo by dojít k translaci proteinu BRCA1 se zkrácenou N-koncovou částí v oblasti RING-finger domény z alternativního iniciačního místa v exonu 4.

V našich vzorcích jsme identifikovali variantu s alternativním exonem 13 o délce 66 bp, která byla popsána v roce 2005 (Fortin et al., 2005). Ačkoliv byla v původní práci pomocí RT-PCR prokázána míra zastoupení této varianty vztažená k expresi všech mRNA genu *BRCA1* do 20 % ve vzorcích leukocytů a mozkové tkáně, u ostatních vyšetřovaných vzorků (buněčné linie karcinomu prsu, prostaty a myeloidní leukemie) byla relativní exprese asi jen 5 %. Tato data ukazují, že exprese varianty BRCA1 s exonem 13 je tkáňově specifická, avšak její význam není dosud objasněn.

Kromě zmíněných variant zachovávajících čtecí rámec BRCA1 mRNA jsme našli tři varianty způsobující posun čtecího rámce. Jejich význam je diskutabilní; pravděpodobnost, že budou odstraňovány pomocí NMD je vysoká.

Největším překvapením, které vyplývá z doposud provedených analýz, není (v celku očekávaná) pestrost v zastoupení sestříhových variant BRCA1 mRNA i ve vzorcích fyziologických tkáních, ale nízká exprese v porovnání s wt BRCA1 mRNA (Favy et al, 2000). Kvantifikaci genové exprese wt BRCA1 mRNA a vybraných ASV BRCA1 jsme věnovali významnou pozornost. Většina doposud zveřejněných údajů hodnotících expresi BRCA1 mRNA je založena na nepřesných výsledcích získaných pomocí nekvantitativní nebo semikvantitativní RT-PCR analýzy či údajů z expresních array (Orban a Olah., 2001), které jsou opakovaně dále citovány v následujících pracích. Z našich dosavadních výsledků vyplývá, že celková exprese BRCA1 mRNA je velmi nízká (přibližně 1000násobně nižší než exprese referenční mRNA genu *UBC*). Nejvyšší exprese byla zaznamenána v leukocytech periferní krve, ve srovnání s ostatními vyšetřovanými tkáněmi (mamární a tuková tkáň). Pacientky s nádorem mamy vykazovaly nesignifikantní snížení celkové exprese BRCA1 mRNA.

Výsledky expresních analýz pěti vyšetřených ASV BRCA1 zatím nepotvrdili naše předpoklady o významu ASV BRCA1. Exprese ani spektrum vyšetřovaných ASV BRCA1 se významně nelišilo mezi skupinou žen s karcinomem prsu a zdravými kontrolami. Exprese všech analyzovaných ASV BRCA1 (s určitou výjimkou BRCA1 Δ 8-9) je ve srovnání

s expresí celkové BRCA1 mRNA velmi nízká a v mnoha vzorcích na hranici detekčního limitu qPCR analýzy. Analýza exprese mRNA obsahující dlouhou formu exonu 10 (10b) ukázala, že tato forma je zcela dominantní ve všech vyšetřovaných tkáních a potvrdila naši domněnku o arteficiální preferenční amplifikaci krátkých sestřihových variant z cDNA připravené pomocí oligo-dT primerů.

V dalším pokračování této práce se zaměříme na kvantifikaci všech identifikovaných ASV BRCA1 v rozšířeném souboru vzorků ze tkání, která umožní statisticky relevantní zhodnocení doposud získaných dat. Nalezené varianty se pokusíme identifikovat v různých buněčných liniích odvozených od karcinomu prsu a dalších nádorů, aby bylo možné popsat jejich dynamiku s ohledem na růstový cyklus buněk a především při genotoxickém poškození.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABRA1	- Abraxas protein 1
AK	- aminokyselina
Akt1	- proteinkináza B α
ASV	- alternativní sestřihová varianta
ATM	- Ataxia telangiectasia mutated
ATR	- Ataxia telangiectasia and RAD3-related
ATRIP	- ATR-interacting protein
AURKA	- Aurora kinase A
BACH	- BRCA1-associated C-terminal helicase / BRIP1
BAP1	- BRCA1-associated protein 1
BARD1	- BRCA1-associated RING domain protein 1
BLM	- Bloom syndrome
B-NHEJ	- Backup NHEJ / alternative
bp	- base pair (pár bází)
BPP	- Branch-point binding protein
BRCA1/2	- Breast Cancer gene 1/2
BRCC36	- BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 36 / BRCC3
BRCT	- BRCA1 C-terminus
CBP/p300	- CREB and p300 binding protein
CC	- Core complex
CDK2	- Cyclin-dependent kinase 2
cDNA	- complementary DNA
cds	- coding sequence (kódující sekvence)
C-NHEJ	- Canonic NHEJ / conservative
CtIP	- C-terminal interacting protein
DBD	- DNA-binding domain (DNA-vazebná doména)
ddH ₂ O	- double distilled H ₂ O
DNA-PKcs	- DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
dNTP	- deoxyribonukleotide triphosphate
DSB	- double strand break (dvouřetězcový zlom)
EDTA	- ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
ER	- estrogen receptor
ESE	- exon splicing enhancer (pozitivní exonový sestřihový regulátor)
ESS	- exon splicing silencer (negativní exonový sestřihový regulátor)
EXO1	- Exonuclease I

HDAC1/2	- Histone deacetylase 1/2
hnRNP	- heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
HR	- homologní rekombinace
CHK 1/2	- Check point kinase 1/2
ISE	- intron splicing enhancer (pozitivní intronový sestřihový regulátor)
ISS	- intron splicing silencer (negativní intronový sestřihový regulátor)
LigIII	- Ligase III
LigIV	- DNA Ligase IV
MRE11	- Meiotic recombination 11
MRN	- MRE11/RAD50/NBS1
mRNA	- mediátorová (messenger) RNA
NBA	- New component of the BRCA1 A complex
NES	- Nuclear export signal (jaderný exportní signál)
NHEJ	- Non-homologous end-joining
NLS	- Nuclear localization signal (jaderný lokalizační signál)
ORF	- Open reading frame (čtecí rámec)
PALB2	- Partner and localizer of BRCA2
PARP1	- Poly (ADP-ribose) polymerase 1
PCR	- Polymerase chain reaction
pre-mRNA	- prekurzorová mRNA
qPCR	- quantitative PCR
RAP80	- Receptor-associated protein, 80-kD
RIN	- RNA integrity number
RING	- really interesting new gene
RNA Pol II	- RNA polymeráza II
RPA	- Replication protein A
rpm	- revolutions per minute (otáčky za minutu)
rRNA	- ribozomální RNA
SCD	- Serine-containing domain (doména bohatá na seriny)
snRNA	- small nuclear RNA (malá jaderná RNA)
snRNP	- small ribonucleoprotein particle (malé jaderné ribonukleoproteiny)
SR	- Serine-arginine-rich (proteiny bohaté na serin a arginin)
SSIII	- Super Script III reverzní transkriptáza
TFII-F/E/H	- Transcription factor II F/E/H
T _m	- melting temperature
TOPBP1	- Topoisomerase II-binding protein 1
U2AF	- U2 auxiliary factor (pomocný faktor U2)
UTR	- Untranslated region (nepřekládaná oblast)
wt	- wild type (divoká forma)

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 5th Edition. New York: *Garland Science*. 2008;345-357. ISBN 978-0-8153-4106-7
- Allemand E, Guil S, Myers M, Moscat J, Cáceres JF, Krainer AR. Regulation of heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 transport by phosphorylation in cells stressed by osmotic shock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(10):3605-10.
- Bartek J, Lukas J, Bartkova J. DNA damage response as an anti-cancer barrier: damage threshold and the concept of 'conditional haploinsufficiency'. *Cell Cycle*. 2007;6(19):2344-7.
- Bartkova J, Tommiska J, Oplustilova L et al. Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene. *Mol Oncol* 2008;2(4):296-316.
- Bartlett JM, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. 2003;226:3-6.
- Blencowe BJ. Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci*. 2000;25(3):106-10.
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J*. 1997;11(1):68-76.
- Brzovic PS, Rajagopal P, Hoyt DW, King MC, Klevit RE. Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat Struct Biol*. 2001;8(10):833-837.
- Cáceres JF, Stamm S, Helfman DM, Krainer AR. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science*. 1994;265(5179):1706-9.
- Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA, Livingston DM. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell*. 2001;105(1):149-160.
- Cao W, Jamison SF, Garcia-Blanco MA. Both phosphorylation and dephosphorylation of ASF/SF2 are required for pre-mRNA splicing in vitro. *RNA*. 1997;3(12):1456-67.
- Ciccio A, Elledge SJ. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*. 2010;40(2):179-204.
- Cowper AE, Cáceres JF, Mayeda A, Sreaton GR. Serine-arginine (SR) protein-like factors that antagonize authentic SR proteins and regulate alternative splicing. *J Biol Chem*. 2001;276(52):48908-14.

- Dever SM, White ER, Hartman MC, Valerie K. BRCA1-directed, enhanced and aberrant homologous recombination: mechanism and potential treatment strategies. *Cell Cycle*. 2012;11(4):687-94.
- Dosil V, Tosar A, Cañadas C, Pérez-Segura P, Díaz-Rubio E, Caldés T, de la Hoya M. Alternative splicing and molecular characterization of splice site variants: BRCA1 c.591C>T as a case study. *Clin Chem*. 2010;56(1):53-61.
- Elia AE, Elledge SJ. BRCA1 as tumor suppressor: lord without its RING? *Breast Cancer Res*. 2012;14(2):306.
- ElShamy WM, Livingston DM. Identification of BRCA1-IRIS, a BRCA1 locus product. *Nat Cell Biol*. 2004;6(10):954-967.
- Fabbro M, Rodriguez JA, Baer R, Henderson BR. BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. *J Biol Chem*. 2002;277(24):21315-24.
- Fairbrother WG, Chasin LA. Human genomic sequences that inhibit splicing. *Mol Cell Biol*. 2000;20(18):6816-25.
- Favy DA, Lafarge S, Rio P, Vissac C, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. Real-time PCR quantification of full-length and exon 11 spliced BRCA1 transcripts in human breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;274(1):73-8.
- Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*. 2006;28(19):1601-13.
- Foretová L, Petráková K, Palácová M, Kalábová R, Svoboda M, Navrátilová M, Schneiderová M, Bolčák K, Krejčí E, Dražan L, Míková M, Hazová J, Vašíčková P, Macháčková E. Genetické testování a prevence hereditárních nádorů v MOÚ – více než desetiletá zkušenost. *Klin onkol* 2010;23(6):388-400.
- Fortin J, Moisan AM, Dumont M, Leblanc G, Labrie Y, Durocher F, Bessette P, Bridge P, Chiquette J, Laframboise R, Lépine J, Lespérance B, Pichette R, Plante M, Provencher L, Voyer P, Simard J. A new alternative splice variant of BRCA1 containing an additional in-frame exon. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1731(1):57-65.
- Fu XD. The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA*. 1995;1(7):663-80.
- Gatei M, Zhou BB, Hobson K, Scott S, Young D, Khanna KK. 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. *J Biol Chem*. 2001;276(20):17276-17280.
- Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C, Mo R, Woo M, Hakem A, Wakeham A, Potter J, Reitmair A, Billia F, Firpo E, Hui CC, Roberts J, Rossant J, Mak TW. The tumor suppressor gene Brca1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell*. 1996;85(7):1009-1023.

- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*. 1990;250(4988):1684-1689.
- Harper JW, Elledge SJ. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell*. 2007;28(5):739-45.
- Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)*. 2007;6(7):923-935.
- Horowitz DS. The mechanism of the second step of pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012;3(3):331-50.
- Chai YL, Cui J, Shao N, Shyam E, Reddy P, Rao VN. The second BRCT domain of BRCA1 proteins interacts with p53 and stimulates transcription from the p21WAF1/CIP1 promoter. *Oncogene*. 1999;18(1):263-268.
- Chen CF, Li S, Chen Y, Chen PL, Sharp ZD, Lee WH. The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem*. 1996;271(51):32863-8.
- Jensen DE, Proctor M, Marquis ST, Gardner HP, Ha SI, Chodosh LA, Ishov AM, Tommerup N, Vissing H, Sekido Y, Minna J, Borodovsky A, Schultz DC, Wilkinson KD, Maul GG, Barlev N, Berger SL, Prendergast GC, Rauscher FJ 3rd. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*. 1998;16(9):1097-1112.
- Karran P. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10(2):144-150.
- Kim H., Chen J., Yu X. Ubiquitin-Binding Protein RAP80 Mediates BRCA1-Dependent DNA Damage Response. *Science*. 2007;316(5828):1202-1205.
- Koonin EV, Altschul SF, Bork P. BRCA1 protein products: Functional motifs. *Nat Genet*. 1996;13(3):266-268.
- Krecic AM, Swanson MS. hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11(3):363-71.
- Lai MC, Lin RI, Tarn WY. Differential effects of hyperphosphorylation on splicing factor SRp55. *Biochem J* 2003; 371(Pt 3):937-945.
- Lee JH, Paull TT. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*. 2005;308(5721):551-554.
- Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature*. 2000;404(6774):201-204.
- Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by thenonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:181-211.

- Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(20):11364-11369.
- Lu M, Conzen SD, Cole CN, Arrick BA. Characterization of functional messenger RNA splice variants of BRCA1 expressed in nonmalignant and tumor-derived breast cells. *Cancer Res*. 1996;56(20):4578-81.
- Mallery DL, Vandenberg CJ, Hiom K. Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *EMBO J*. 2002;21(24):6755-6762.
- Maniccia AW, Lewis C, Begum N, Xu J, Cui J, Chipitsyna G, Aysola K, Reddy V, Bhat G, Fujimura Y, Henderson B, Reddy ES, Rao VN. Mitochondrial localization, ELK-1 transcriptional regulation and growth inhibitory functions of BRCA1, BRCA1a, and BRCA1b proteins. *J Cell Physiol*. 2009;219(3):634-41.
- Manke IA, Lowery DM, Nguyen A, Yaffe MB. BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*. 2003;302(5645):636-639.
- Mateju M, Stribrna J, Zikan M, Kleibl Z, Janatova M, Kormunda S, Novotny J, Soucek P, Petruzelka L, Pohlreich P. Population-based study of BRCA1/2 mutations: family history based criteria identify minority of mutation carriers. *Neoplasma*. 2010;57(3):280-5.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994;266(5182):66-71.
- Mladenov E, Iliakis G. Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res*. 2011;711(1-2):61-72.
- Monteiro AN, August A, Hanafusa H. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):13595-13599.
- Morris JR, Solomon E. BRCA1 : BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet*. 2004;13(8):807-817.
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*. 2008;320(5881):1344-9.
- Nam DK, Lee S, Zhou G, Cao X, Wang C, Clark T, Chen J, Rowley JD, Wang SM. Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(9):6152-6.
- Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(9):665-76.

- Oldenburg RA, Meijers-Heijboer H, Cornelisse CJ et al. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Crit Rev Oncol Hematol* 2007;63(2):125-149.
- Orban TI, Olah E. Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *Mol Pathol.* 2003;56(4):191-7.
- Orban TI, Olah E. Expression profiles of BRCA1 splice variants in asynchronous and in G1/S synchronized tumor cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(1):32-8.
- Ouchi T. BRCA1 phosphorylation: biological consequences. *Cancer Biol Ther.* 2006;5(5):470-475.
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet.* 2008;40(12):1413-5.
- Paull TT, Cortez D, Bowers B, Elledge SJ, Gellert M. Direct DNA binding by Brca1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(11):6086-6091.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(9):e36.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
- Pohlreich P, Stribrna J, Zikan M, Novotny J. Splice variants of BRCA1 and BRCA2 genes identified in high-risk Czech breast and ovarian cancer families. *19th Meeting of European Association for Cancer Research Program/Proceedings, Budapest 2006*;p260-p260.
- Pohlreich P, Zikan M, Stribrna J, Kleibl Z, Janatova M, Kotlas J, Zidovska J, Novotny J, Petruzalka L, Szabo C, Matous B. High proportion of recurrent germline mutations in the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res.* 2005;7(5):R728-36.
- Pollard TD, Earnshaw WC. *Cell Biology.* 2nd Edition. Philadelphia: *Saunders Elsevier.* 2008;282-285. ISBN 1-4160-2255-4
- Rodríguez JA, Henderson BR. Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1. *J Biol Chem.* 2000;275(49):38589-96.
- Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* 2003;23(16):5706-15.
- Scully R, Anderson SF, Chao DM, WeiW, Ye L, Young RA, Livingston DM, Parvin JD. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997a;94(11):5605-5610.

- Scully R, Chen J, Plug A, Xiao Y, Weaver D, Feunteun J, Ashley T, Livingston DM. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*. 1997b;88(2):265–275.
- Sevcik J, Falk M, Kleiblova P, Lhota F, Pohlreich P, Kleibl Z. In vitro analysis of population specific BRCA1 splicing variants (P- 507). *Eur J Cancer Suppl*. 2010;8(5):S130-S130
- Sevcik J, Falk M, Kleiblova P, Lhota F, Stefancikova L, Janatova M, Weiterova L, Lukasova E, Kozubek S, Pohlreich P, Kleibl Z. The BRCA1 alternative splicing variant Δ 14-15 with an in-frame deletion of part of the regulatory serine-containing domain (SCD) impairs the DNA repair capacity in MCF-7 cells. *Cell Signal*. 2012;24(5):1023-30.
- Shen H, Green MR. A pathway of sequential arginine-serine-rich domain-splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly. *Mol Cell*. 2004 Nov;16(3):363-73.
- Shukla S, Oberdoerffer S. Co-transcriptional regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochim Biophys Acta*. 2012
- Scholzová E, Malík R, Sevcík J, Kleibl Z. RNA regulation and cancer development. *Cancer Lett*. 2007;246(1-2):12-23.
- Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, Hood L, King MC. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res*. 1996;6(11):1029-1049.
- Thakur S, Zhang HB, Peng Y, Le H, Carroll B, Ward T, Yao J, Farid LM, Couch FJ, Wilson RB, Weber BL. Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol Cell Biol*. 1997;17(1):444-452.
- Thomassen M, Blanco A, Montagna M, Hansen TV, Pedersen IS, Gutiérrez-Enríquez S, Menéndez M, Fachal L, Santamariña M, Steffensen AY, Jønson L, Agata S, Whiley P, Tognazzo S, Tornero E, Jensen UB, Balmaña J, Kruse TA, Goldgar DE, Lázaro C, Diez O, Spurdle AB, Vega A. Characterization of BRCA1 and BRCA2 splicing variants: a collaborative report by ENIGMA consortium members. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;132(3):1009-23.
- Thompson ME, Robinson-Benion CL, Holt JT. An amino-terminal motif functions as a second nuclear export sequence in BRCA1. *J Biol Chem*. 2005;280(23):21854-7.
- Ticha I, Kleibl Z, Stribrna J, Kotlas J, Zimovjanova M, Mateju M, Zikan M, Pohlreich P. Screening for genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2 genes in Czech high-risk breast/ovarian cancer patients: high proportion of population specific alterations in BRCA1 gene. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;124(2):337-47.
- Valadkhan S, Manley JL. Characterization of the catalytic activity of U2 and U6 snRNAs. *RNA*. 2003;9(7):892-904.
- Wang B, Hurov K, Hofmann K, Elledge SJ. NBA1, a new player in the BRCA1 A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control. *Genes Dev*. 2009;23(6):729-739.

- Wang B, Matsuoka S, Ballif BA, Zhang D, Smogorzewska A, Gygi SP, Elledge SJ. Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science*. 2007;316(5828):1194-1198.
- Wang H, Shao N, Ding QM, Cui J, Reddy ES, Rao VN. BRCA1 proteins are transported to the nucleus in the absence of serum and splice variants BRCA1a, BRCA1b are tyrosine phosphoproteins that associate with E2F, cyclins and cyclin dependent kinases. *Oncogene*. 1997;15(2):143-57.
- Williams RS, Green R, Glover JN. Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1. *Nat Struct Biol*. 2001;8(10):838-842.
- Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J Biol Chem*. 1997;272(51):31941-31944.
- Wood MJ, Gait MJ, Yin H. RNA-targeted splice-correction therapy for neuromuscular disease. *Brain*. 2010;133(Pt 4):957-72.
- Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet*. 1996;14(4):430-440.
- Yang ES, Xia F. BRCA1 16 years later: DNA damage-induced BRCA1 shuttling. *FEBS J*. 2010;277(15):3079-85.
- Yu X, Chen J. DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol Cell Biol*. 2004;24(21):9478-9486.
- Yuli C, Shao N, Rao R, Aysola P, Reddy V, Oprea-Illies G, Lee L, Okoli J, Partridge E, Reddy ES, Rao VN. BRCA1a has antitumor activity in TN breast, ovarian and prostate cancers. *Oncogene*. 2007;26(41):6031-7.

Internetové zdroje:

Databáze OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>