

Abstrakt

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