

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biologie

Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Kristýna Judasová

Studium populačně specifických alterací v genech predisponujících
ke vzniku karcinomu prsu v ČR

Study of population specific alterations of breast cancer predisposition genes
in Czech Republic

Diplomová práce

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

Praha 2016

Prohlášení:

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

V Praze 15. 8. 2015

Kristýna Judasová

Poděkování:

Tímto děkuji mému školiteli Mgr. Janu Ševčíkovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc v laboratoři, cenné rady a trpělivost při zpracovávání této diplomové práce. Za ochotu a pomoc také děkuji celému kolektivu Laboratoře onkogenetiky Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. LF Univerzity Karlovy.

Abstrakt

Karcinom prsu je celosvětově nejčastějším maligním onemocněním u žen. Zhruba 10 % všech případů je hereditárního původu. V České republice je hlavním genetickým faktorem predisponujícím ke vzniku karcinomu prsu inaktivace tumor supresorového genu *BRCA1*. Hlavní funkcí *BRCA1* je účast na opravě dvouřetězcových zlomů. V závislosti na buněčném cyklu je toto poškození opravováno nehomologním spojováním volných konců (NHEJ) nebo homologní rekombinací (HR). Při genetickém vyšetření pacientů z vysoce rizikových rodin jsou velmi často detekovány alternativní sestřihové varianty *BRCA1*, jejichž klinický význam je zcela neznámý. Vysvětlení podstaty hereditární formy karcinomu prsu je přitom kritickým faktorem pro včasnou diagnostiku a cílenou léčbu tohoto onemocnění. Na základě předchozích výsledků výzkumů prováděných na Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. Lékařské Fakulty Univerzity Karlovy byly vybrány dvě alternativní sestřihové varianty opakovaně detekované u vyšetřovaných jedinců.

Cílem této práce bylo posoudit vliv alternativních sestřihových variant *BRCA1Δ5* a *BRCA1Δ10* na opravu dvouřetězcových zlomů DNA. Po zvýšení exprese těchto alternativních sestřihových variant v buňkách modelového systému, bylo provedeno stanovení aktivity HR a NHEJ pomocí *in vitro* DNA reparační analýzy. Dále byla stanovena buněčná lokalizace vyšetřovaných variant pomocí fluorescenční mikroskopie. Bylo zjištěno, že alternativní sestřihová varianta *BRCA1Δ5* statisticky významně snižuje aktivitu HR, ale nemá vliv na chybovost NHEJ. U varianty *BRCA1Δ10* nebyla detekována žádná změna aktivity HR ani NHEJ. Přesto, že *BRCA1Δ5* ovlivňuje aktivitu HR, důvodem není změna buněčné lokalizace. Buněčná lokalizace této varianty byla přednostně jaderná, stejně jako u *wtBRCA1*. I když varianta *BRCA1Δ10* postrádá jaderné lokalizační signály, byla také kolokalizována s *wtBRCA1* v jádře.

Výsledky této práce naznačují, že porucha alternativního sestřihu vedoucí k aberantní produkci sestřihových izoforem *BRCA1* může negativně ovlivňovat proces opravy dvouřetězcových zlomů a přispívat tak ke genové instabilitě a potenciálně k maligní transformaci.

Klíčová slova:

Karcinom prsu, *BRCA1*, homologní rekombinace, nehomologní spojování volných konců, alternativní sestřih.

Abstract

Breast cancer is the most frequent malignant disease in the female population worldwide. About 10 % of all cases are of hereditary origin. The inactivation of tumor suppressor gene *BRCA1* is the main genetic predisposing factor in breast cancer in the Czech Republic. Primarily, BRCA1 participates in DNA double strand break repair. Depending on cell cycle phase, the damage is repaired by homologous recombination or non-homologous end joining. Alternative splicing variants of BRCA1 are frequently detected during the genetic screening of high risk patients. The clinical significance of these variants is unknown. Understanding of the nature of breast cancer genetics is the critical factor for early diagnosis. Based on earlier studies from the Institute of Biochemistry and Experimental Oncology 1st Faculty of Medicine Charles University, two alternative splicing variants which were repeatedly detected in patients, were chosen for functional analysis.

The aim of this work is to investigate the impact of alternative splicing variants BRCA1 Δ 5 and BRCA1 Δ 10 on DNA double strand breaks repair. Particular variants were over-expressed in the cells of model system. Activity of homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ) was scored by *in vitro* DNA repair assay. The cellular localization of alternative splicing variants was determined by a fluorescent microscopy. It was found that BRCA1 Δ 5 statistically decreases the activity of HR but does not have the impact on NHEJ. BRCA1 Δ 10 did not alter the activity of HR or NHEJ. Despite the fact that BRCA1 Δ 5 has an impact on HR activity, it is not caused by changes in cell localization. Cell localization of BRCA1 Δ 5 was predominantly nuclear, same as for wtBRCA1. BRCA1 Δ 10 was co-localized with wtBRCA1 in nucleus, even though it lacks nuclear localization signals.

The results of this work indicates that defective alternative splicing of BRCA1, which forms aberrant splicing isoforms, can have a negative impact on DNA double strand breaks repair. These defects may lead to genome instability and potentially to malignant transformation.

Key words:

Breast cancer, BRCA1, homologous recombination, non-homologous end joining, alternative splicing

Obsah

Seznam použitých zkratk:	8
1 Úvod	12
2 Současný stav řešené problematiky	14
2.1 Gen BRCA1	14
2.1.1 Transkript genu <i>BRCA1</i>	14
2.2 BRCA1 protein	16
2.2.1 RING doména	16
2.2.2 BRCT doména	17
2.2.3 Centrální region	18
2.3 Buněčná lokalizace BRCA1	19
2.3.1 Jaderná lokalizace	19
2.3.2 Cytoplasmatická lokalizace	20
2.4 Interakce s BRCA1 vazebnými partnery	20
2.5 BRCA1 komplexy	21
2.5.1 BRCA1-A komplex	21
2.5.2 BRCA1-B komplex	21
2.5.3 BRCA1-C komplex	22
2.6 Funkce BRCA1	22
2.6.1 Oprava poškozené DNA	22
2.6.2 Regulace centrosomu	26
2.6.3 Apoptóza	26
2.7 Alternativní sestřih	27
2.7.1 Regulační úloha alternativního sestřihu	30
2.7.2 Alternativní sestřih <i>BRCA1</i>	31
3 Materiál a metody	34
3.1 Příprava expresních vektorů	34
3.1.1 Příprava AS variant	34
3.1.2 Ligace	38
3.1.3 Transformace kompetentních buněk	42
3.1.4 PCR s buněčnou suspenzí	42
3.1.5 Sekvenace	43
3.2 Modelové systémy	44
3.3 Práce s buněčnými kulturami	44

3.3.1	Transfekce buněk linie U-2 OS	45
3.3.2	Transfekce buněk linie MCF7	45
3.4	Izolace proteinů a western blotting	46
3.4.1	SDS-PAGE elektroforéza	46
3.4.2	Western blotting.....	47
3.5	DNA reparační analýza	48
3.6	Fluorescenční mikroskopie	50
4	Cíle práce.....	52
5	Výsledky.....	54
5.1	Příprava expresních vektorů s inserty alternativních sestřihových variant BRCA1 Δ 5 a Δ 10.....	54
5.2	Ověření funkčnosti modelového systému	56
5.3	Stanovení vlivu modifikace exprese genu <i>BRCA1</i> na aktivitu hlavních drah opravy dvouřetězcových zlomů DNA.....	58
5.4	Buněčná lokalizace alternativních sestřihových variant BRCA1 Δ 5 a Δ 10 v buňkách modelového systému.....	61
6	Diskuze:.....	64
7	Závěr:.....	68
8	Literatura:	70

Seznam použitých zkratk:

2nd PCR	Druhý krok metody sestřihové PCR
AK	Aminokyselina
alt-NEHJ	Alternativní (chybové) nehmologní spojování volných konců
APS	Amonium persulfát
AS	Alternativní sestřih
ATM	Kináza účastnící se odpovědi na poškození DNA („Ataxia telangiectasia mutated“)
ATR	Kináza účastnící se odpovědi na poškození DNA („Ataxia telangiectasia and Rad3 related“)
B. E.	Enzym pro otupení konců sekvencí před ligací („Blunting enzyme“)
BARD1	Hlavní vazebný partner proteinu BRCA1 („BRCA1-associated RING domain protein 1“)
BBP	Důležitá sekvence pro skládání spliceosomu při alternativním sestřihu („Branch point binding protein“)
BC	Buněčný cyklus
BCA	Kyselina bicinchoninová
BCA1Δ10q	Alternativní sestřihová varianta genu <i>BRCA1</i> s delecí části exonu 10
bp	Velikost sekvence v párech bází („base pairs“)
BRCA1	Gen/protein predisponující ke vzniku karcinomu prsu a/nebo ovarií („Breast cancer gene 1“)
BRCA1Δ10	Alternativní sestřihová varianta genu <i>BRCA1</i> s delecí části exonu 10
BRCA1Δ5	Alternativní sestřihová varianta genu <i>BRCA1</i> s delecí exonu 5
BRCA1Δ8,9	Alternativní sestřihová varianta genu <i>BRCA1</i> s delecí exonů 8 a 9
BRCA1Δ8,9,10q	Alternativní sestřihová varianta genu <i>BRCA1</i> s delecí exonů 8, 9 a částí exonu 10
BRCT	C-terminální doména proteinu BRCA1 („BRCA1 C-terminal domain“)

c-NHEJ	Klasické (méně chybové) nehomologní spojování volných konců
CRM1	Jaderný exportní receptor („Chromosome region maintenance protein 1“)
DBR	DNA vazebný region („DNA binding region“)
DDR	Odpověď buňky na poškození DNA („DNA damage response“)
dH ₂ O	Deionizovaná voda
DMEM	Médium pro kultivaci buněčných linií („Dulbecco-modified Eagles medium“)
DNA-PK _{CS}	DNA-dependentní kináza
dNTP	Deoxynukleotid trifosfát
DSB	Dvouřetězcový zlom („double strand break“)
dsRed	Červený fluorescenční protein
ESE	Zesilovač sestřihu („exon splicing enhancer“)
ESS	Zeslabovač sestřihu (exon splicing silencer)
FCS	Fetální telecí sérum
GFP	Zelený fluorescenční protein („Green fluorescent protein“)
GSF	Obecné sestřihové faktory („general splicing factors“)
hnRNP	Heterogenní jaderný ribonukleoprotein („heterogenous nuclear ribonucleoprotein“)
HR	Homologní rekombinace
ChK2	Kináza účastnící se odpovědi na buněčný stres („Checkpoint kinase 2“)
MCF7	Buňěčná linie
MDC1	Protein rozpoznávající fosforylované histony H2AX („Mediator of DNA damage checkpoint protein 1“)
MRN	Komplex proteinů Mre11 – Rad50 – Nbs1
NES	Jaderný exportní signál („nuclear export signal“)
NHEJ	Nehomologní spojování volných konců („non-homologous end joining“)

NLS	Jaderný lokalizační signál („nuclear localization signal“)
PBS	Fosfátový pufr
pcDNA3.1-	Expresní vektor nesoucí insert
peGFP-Max	Expresní vektor nesoucí zelený fluorescenční protein
pm-Cherry-	Expresní vektor nesoucí insert a gen pro referenční červený protein m-Cherry
pOPRSVI-YFP	Expresní vektor nesoucí segment kódující žlutý fluorescenční protein
pre-mRNA	Prekurzorová mRNA
pSUPER	Expresní vektor nesoucí interferenční RNA
PVDF	Polyvinyliden difluorid
RING	N-terminální doména proteinu BRCA1 („Really interesting gene“)
RNF8	E3 ubkvitin ligáza („Ring finger protein 8“)
RPA	Replikační protein A výzající se na jednovláknovou DNA („Replication protein A“)
RRM	RNA-rozpoznávající motiv, součást proteinů bohatých na serin
RS	C-terminální doména proteinů bohatých na serin
S. O. C.	Médium („Super optimal broth with catabolite repression“)
SCD	Doména bohatá na serin („serine containing domain“)
SDS	Dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	Elektroforéza pro rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti za denaturujících podmínek
snRNP	Malé jaderné ribonukleoproteiny („small nuclear ribonucleoprotein“)
SR	Proteiny bohaté na serin, účastní se alternativního sestřihu („Serine-rich“)
TBS	Tris pufr („Tris-buffered saline“)
TBSt	Tris pufr s 0,1% Tween20
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin

U-2 OS	Buněčná linie
wt	přírozeně/původně se vyskytující („wild-type“)
YFP	Žlutý fluorescenční protein („Yellow fluorescent protein“)

1 Úvod

Karcinom prsu patří dlouhodobě a celosvětově k nejčastějšímu nádorovému malignímu onemocnění u žen. I přes neustále stoupající incidenci se mortalita v poslední dekádě nemění. To je dáno především rozvojem našich znalostí o vzniku a průběhu tohoto onemocnění. Detailní znalost faktorů ovlivňujících riziko vzniku karcinomu prsu je kritická pro jeho včasnou diagnostiku, preventivní opatření a použití cílené terapie, které zajišťují relativně vysokou šanci přežití. Zhruba 10 % případů karcinomu prsu vykazuje řadu znaků Mendelovské dědičnosti. Tato skutečnost naznačuje silnou genetickou predispozici pro vznik tohoto onemocnění. Dědičná forma karcinomu prsu se typicky projevuje vznikem nádorových novotvarů ve velmi nízkém věku, vznikem bilaterální formy karcinomu a jeho častým opakováním. Snahou řady vědeckých pracovišť do současné doby zůstává identifikace genetických faktorů zvyšujících riziko vzniku karcinomu prsu.

V české populaci je nejdůležitějším genetickým faktorem gen *BRCA1*. Na základě dosud popsáných mechanismů inaktivace tumor supresorového genu *BRCA1* (bodové mutace, rozsáhlé genomové přestavby, nebo hypermethylace promotoru) je možné uspokojivě vysvětlit vznik 25 % všech hereditárních karcinomů prsu. Velká skupina pacientů s karcinomem prsu, u kterých nebyla nalezena příčinná alterace v genu *BRCA1*, však vykazuje znaky typické pro *BRCA1*-pozitivní karcinom prsu (agresivní tripl-negativní tumor s vysokým gradingem). Tato skutečnost naznačuje možnost existence dosud nepopsaného mechanismu inaktivace *BRCA1*. Vzhledem k relativně časté detekci sestřihových variant genu *BRCA1* při genetickém vyšetření vysoce rizikových pacientů, je alternativní sestřih jedním z možných mechanismů vedoucích ke vzniku aberantních proteinových izoform.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Gen BRCA1

V roce 1990 se pomocí vazebných analýz na souboru 23 rodin s hereditárním karcinomem prsu poprvé podařilo spojit vznik tohoto onemocnění s chromosomem 17q21 (Hall et al., 1990). O několik let později byla pomocí pozičního klonování v úseku chromosomu 17q21.31 (MIM 604370) zjištěna kódující sekvence (cDNA) genu *Breast Cancer 1 Gene (BRCA1)* (OMIM*113705) (Miki et al., 1994).

Sekvence genu *BRCA1* zaujímá celkovou délku 81 kilo-bází (kb) a obsahuje 24 exonů. Nejrozsáhlejším exonem je exon 10, který zaujímá asi 60 % kódující sekvence genu. Sekvence *BRCA1* je bohatá na *Alu* repetice (41,5 %), díky kterým může docházet k přestavbám a inaktivaci genu (Smith et al., 1996).

Začátek (5' konec) genu *BRCA1* leží v duplikované části chromosomu 17q21, ve které se nachází exon 1a, 1b a 2 a okolní introny. Duplikací této části chromosomu vznikl *BRCA1* pseudogen (ψ *BRCA1*), který je vzdálený 30 kb od iniciačního kodonu genu *BRCA1* (upstream). Mezi sekvencemi genu a pseudogenu *BRCA1* může docházet k rekombinacím, jejichž důsledkem jsou delece (Puget et al., 2002).

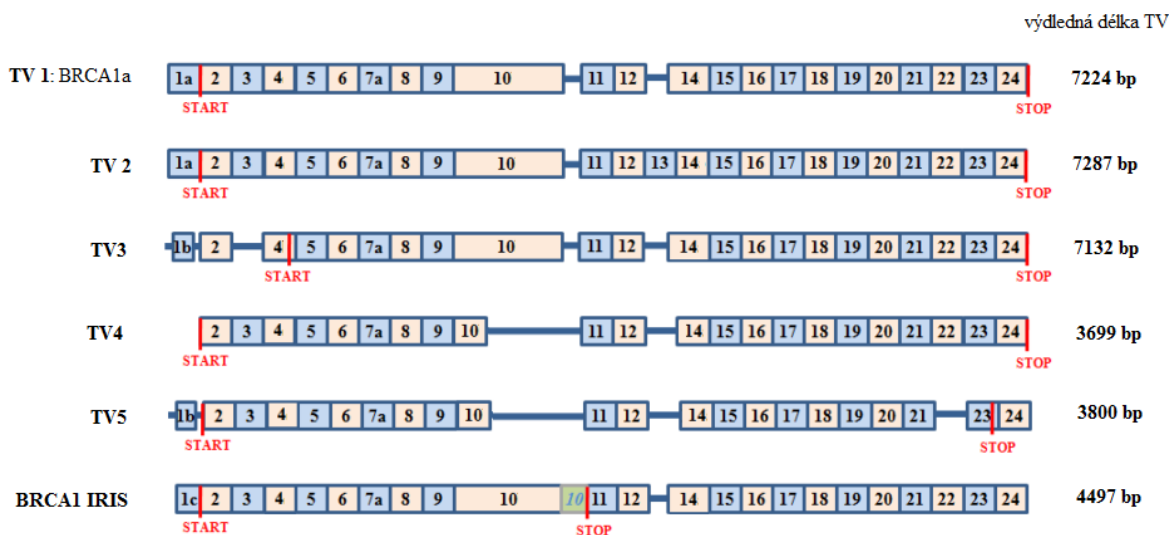
2.1.1 Transkript genu *BRCA1*

Translatovaná část genu *BRCA1* se skládá z 22 kódujících exonů a jednoho alternativního exonu 13. Na 5' konci genu *BRCA1* se ve dvou rozdílných variantách vyskytuje nekódující exon 1 – exon 1a a 1b (Xu et al., 1995). Každý z těchto exonů je translatován v důsledku aktivace jednoho ze dvou promotorů (α nebo β) (Xu et al., 1997). Přítomnost více promotorů a post-transkripční úpravy prekurzorové mRNA (pre-mRNA) dovolují vzniku šesti přirozeně se vyskytujících transkripčních variant genu *BRCA1* (Obr. I).

Transkripční varianta 1 (NM_007294.3), označována také jako *BRCA1a*, je z kvantitativního hlediska nejvíce se vyskytující variantou genu *BRCA1*. Její délka činí 7224 párů bází (bp – „base pairs“) a kóduje protein v celé jeho délce („full-length“) – 1863 aminokyselin (AK). *Transkripční varianta 2* (NM_007300.3) je dlouhá 7287 bp. Tato varianta obsahuje alternativní kódující exon 13, díky němuž je výsledná délka proteinu v porovnání s transkripční variantou 1 delší. *Transkripční varianta 3* (NM_007297.3) je

dlouhá 7132 bp. Ve své sekvenci obsahuje exon 1b a postrádá část 5' konce. Při translaci je využíván alternativní start kodon v exonu 4. Výsledný protein je tedy na N-konci zkrácený. *Transkripční varianta 4* (NM_007298.3) je se svou velikostí 3699 bp nejkratší transkripční variantou genu *BRCA1*. Postrádá exon 1, a protože využívá alternativní „in frame“ sestřihová místa v centrálním exonu 10, je zkrácena i o značnou část tohoto exonu. *Transkripční varianta 5* (NM_007299.3) je dlouhá 3800 bp. Obsahuje exon 1b, využívá „in frame“ sestřihová místa v centrálním exonu 10 a postrádá exon 22. Přeskočení exonu 22 má za následek změnu čtecího rámce a pozměněný C-konec výsledného proteinu. *Transkripční varianta 6* (NR_027676.1) je dlouhá 7128 bp, je označována jako nekódující a její funkce není známa.

Byla identifikována ještě jedna často se vyskytující varianta genu *BRCA1*, která se neřadí mezi transkripční varianty. Označuje se jako *BRCA1 IRIS* a její délka je 7128 bp. Při translaci je využíván předčasný stop kodon v intronu 10. Exprese *BRCA1 IRIS* začíná exonem 1 a končí 337 bp v intronu 10. Výsledný protein poté odpovídá 1365 aminokyselinami na N-terminálním konci transkripční variantě 1 a dále obsahuje specifických 34 aminokyselin (ElShamy and Livingston, 2004).



Obr. 1: Transkripční varianty genu *BRCA1*. Pět přirozeně se vyskytujících transkripčních variant (TV) genu *BRCA1* a *BRCA1 IRIS* (TV6 není znázorněna). Jako „full-length“ je označována TV1. TV2 obsahuje alternativní exon 13. TV5 a *BRCA1 IRIS* obsahují předčasný STOP kodon. Iniciační translační kodon je označen jako START.

Kromě výše zmíněných transkripčních variant bylo u genu *BRCA1* dosud identifikováno velké množství alternativních sestřihových variant. Všechny známé transkripční i alternativní sestřihové varianty byly nalezeny jak v krvi, tak v prsní tkáni a nemají žádnou tkáňovou specificitu (Romero et al., 2015).

2.2 BRCA1 protein

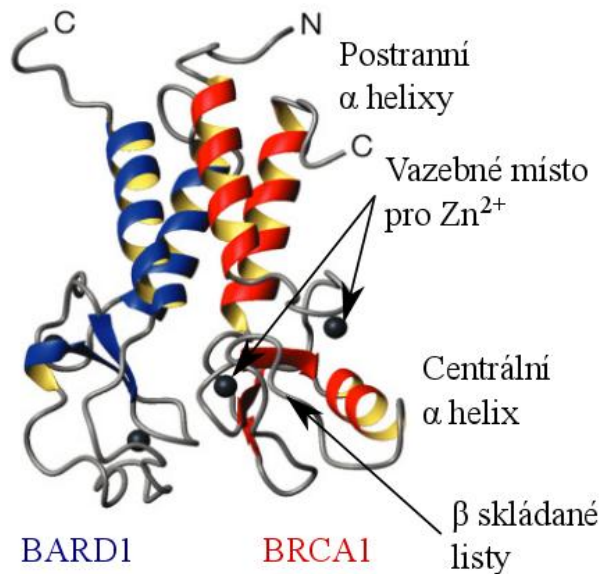
Protein BRCA1 je predominantně jaderný multifunkční fosfoprotein, jehož množství v buňce se mění v závislosti na buněčném cyklu (Ruffner and Verma, 1997). Nezkrácený protein BRCA1 se skládá z 1863 aminokyselin (Miki et al., 1994) a jeho molekulová hmotnost je 220 kDa (Chen et al., 1996). Přestože u proteinu BRCA1 byla popsána E3 ubikvitin ligázová aktivita (Lorick et al., 1999), funkčně se jedná o protein interakční modulátor (Scully et al., 1999).

Protein BRCA1 se skládá ze tří významných regionů – N-terminální domény, centrálního regionu a C-terminální domény – prostřednictvím kterých interaguje se svými vazebnými partnery. Především tyto interakce podmiňují biologickou aktivitu a funkci BRCA1 proteinu.

2.2.1 RING doména

Na N-konci proteinu BRCA1 se nachází vysoce konzervovaná RING („Really interesting gene“) doména (Obr. II). Skládá se z RING prstu, α helixů a β skládaných listů. RING-prst je složen z centrálního α helixu, tří β skládaných listů a dvou postranních α helixů („flanking“ α helixy) (Obr. II) (Clark et al., 2012). Sedm konzervovaných cysteinů a jeden histidin tvoří ve struktuře RING-prstu dvě vazebná místa pro Zn^{2+} atomy (Obr. II). Pomocí Zn^{2+} atomů dochází ke stabilizaci domény (Bienstock et al., 1996).

RING doména poskytuje proteinu E3 ubikvitin ligázovou aktivitu (Lorick et al., 1999), která je důležitá pro funkci BRCA1 jako tumorového supresoru. E3 ubikvitin ligázová aktivita je významně potencována vazbou hlavního vazebného partnera BARD1 k BRCA1 (Hashizume et al., 2001). Kromě toho, se ve struktuře RING domény nachází dvě aminokyselinové sekvence zodpovědné za export BRCA1 z jádra (NES – „nuclear export signal“) (Rodriguez and Henderson, 2000; Thompson et al., 2005).

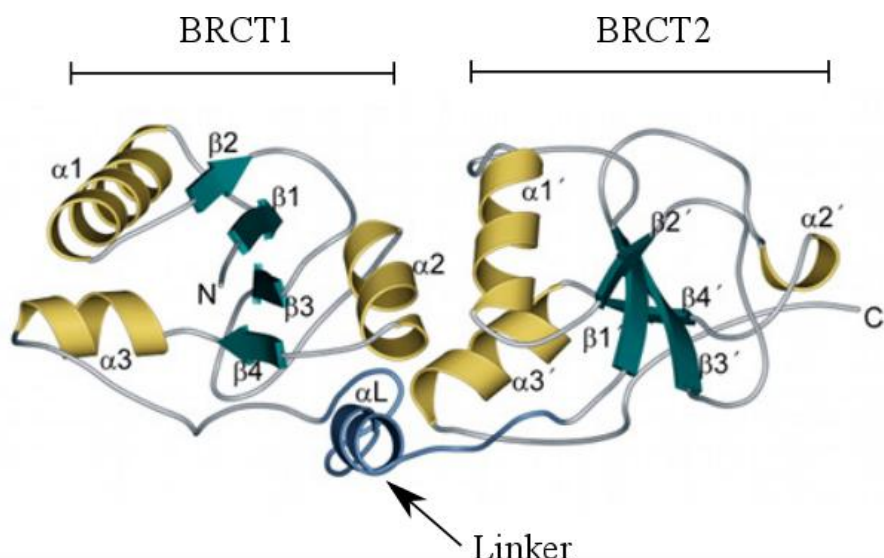


Obr. II: Struktura RING domény. RING doména se skládá z centrálního α helixu, tří β skládaných listů a dvou postranních α helixů na N a C konci domény. Interakce proteinu BRCA1 s vazebným partnerem BARD1 je zprostředkována RING doménami obou partnerů (upraveno podle Brzovic et al., 2001).

2.2.2 BRCT doména

Fosfoprotein-interakční BRCA1 C-terminální (BRCT) doména se nachází na C-konci proteinu ve dvou tandemových opakováních, BRCT1 a BRCT2 (Obr. III). Každé BRCT opakování ve své struktuře obsahuje β skládaný list složený ze čtyř řetězců (Obr. III). Beta skládaný list je z obou stran obklopen α helixy, na jedné straně jedním a na druhé straně dvěma (Obr. III). BRCT opakování jsou spojena 22 aminokyselin dlouhým linkerem (Obr. III) (Williams et al., 2001). BRCT domény mezi sebou interagují a tvoří hydrofobní jádro pro vazbu proteinů. Interakce mezi BRCT opakováními také stabilizuje strukturu domény (Brzovic et al., 2001).

Prostřednictvím BRCT domény se k proteinu BRCA1 váží fosforylované proteiny (Yu et al., 2003). BRCT doména váže fosfo-serinové zbytky proteinů fosforylovaných ATM („Ataxia telangiectasia mutated“) nebo ATR („Ataxia telangiectasia and Rad3 related“) kinázami (Clark et al., 2012). Bylo také zjištěno, že BRCA1 se prostřednictvím BRCT domény váže do místa dvouřetězcových zlomů DNA (DSB – „double strand breaks“) (Yamane et al., 2000). Kromě BRCA1 je BRCT doména přítomna v celé řadě proteinů, podílejících se přímo na opravě DNA.



Obr. III: Struktura BRCT domény. BRCT doména se skládá ze dvou identických opakování BRCT1 a BRCT2. BRCT region je složen ze čtyř β skládaných listů ($\beta 1 - \beta 4$, $\beta 1' - \beta 4'$) obklopených třemi α helixy ($\alpha 1 - \alpha 3$, $\alpha 1' - \alpha 3'$). BRCT1 a BRCT2 jsou spojeny linkerem (upraveno podle Williams et al., 2001).

2.2.3 Centrální region

V centrálním regionu proteinu BRCA1, který je kódován exony 10 – 12 (Clark et al., 2012), se nachází dva jaderné lokalizační signály (NLS – „nuclear localisation signal“), protein interakční „coiled-coil“ doména (CCD) a oblast bohatá na serinové zbytky (SCD – „serine containing domain“), která je cílem fosforylace řadou kináz (ATM, ATR, DNA-PK).

Většinu centrálního regionu proteinu BRCA1 kóduje exon 10. Právě v této oblasti se nachází dva NLS, směřující protein do jádra (Thakur et al., 1997). Mezi regionem kódovaným exonem 10 a BRCT se nachází CCD, která zprostředkovává vazbu k proteinu PALB2 („Partner and localizer of BRCA2“) (Sy et al., 2009), a SCD doména v jejíž oblasti dochází k fosforylaci proteinu BRCA1 ATM a ChK2 („Checkpoint kinase 2“) kinázami (Kim et al., 1999; O’Neill et al., 2000). K fosforylaci dochází při odpovědi na vznik dvouřetězcových zlomů DNA (Matsuoka et al., 2007). Ovšem funkce centrálního regionu je zatím relativně málo prostudována a struktura na atomární úrovni ještě nebyla popsána (Clark et al., 2012).

V centrálním regionu se nachází nedávno popsáný DNA vazebný region (DBR – „DNA binding region“). Esenciální DBR se vyskytuje mezi 421 až 701 aminokyselinou, včetně. Vazba BRCA1 na DNA prostřednictvím DBR není sekvenčně specifická. K vazbě dochází na místech poškození DNA. Pokusy *in vivo* odhalily, že delece DBR ovlivňuje

kontrolní bod v S-fázi buněčného cyklu (BC). Dochází ke tvorbě abnormálních chromosomů. Naopak na homologní rekombinaci delece DBR nemá vliv. Zdá se tedy, že DBR je důležitá pro kontrolu replikace v S-fázi BC (Masuda et al., 2016).

2.3 Buněčná lokalizace BRCA1

Přednostně je BRCA1 lokalizován v jádře, ale vyskytuje se také v cytoplasmě. Distribuce BRCA1 v rámci jádra i cytoplasmy je závislá na vazebných partnerech proteinu a funkci (Henderson, 2012).

2.3.1 Jaderná lokalizace

K translokaci BRCA1 do jádra dochází více způsoby. Jedním z nich je import do jádra pomocí importinu- α/β . Tato cesta je závislá na dvou NLS nacházejících se ve struktuře proteinu (Thakur et al., 1997). U sestřihových variant BRCA1, které díky alternativnímu sestřihu postrádají region obsahující NLS, dochází k translokaci do jádra díky vazbě s BARD1. Heterodimer se na importin- α/β váže díky NLS nacházejících se ve struktuře BARD1 (Fabbro et al., 2002). Existuje také ještě třetí, alternativní, cesta importu BRCA1 do jádra (Qin et al., 2011).

Export proteinu BRCA1 závisí na vazbě exportního receptoru CRM1 („Chromosome region maintenance protein 1“) k NES (Rodriguez and Henderson, 2000). Na komplex BRCA1-CRM1 se váže regulační Ran-GTPasa a dochází k exportu. Hydrolýzou GTP v cytoplasmě komplex disociuje a protein je uvolněn (Ossareh-Nazari et al., 2001). Prostřednictvím regionu, ve kterém se nachází NES (RING doména), dochází k vazbě BRCA1 s proteinem BARD1. Tato vazba maskuje NES, nemůže tak dojít k interakci s CRM1 a BRCA1 zůstává v jádře (Fabbro et al., 2002; Thompson et al., 2005).

V jádře se BRCA1 účastní regulace procesů jako je aktivace kontrolních bodů BC a remodelace chromatinu (Starita and Parvin, 2003). Bylo zjištěno, že ve spojení s hyperfosforylací dochází během S-fáze BC k importu a akumulaci BRCA1 v jádře (Ruffner and Verma, 1997; Okada and Ouchi, 2003). Exprese BRCA1 je nejvyšší během mitózy. Jakmile buňka vstupuje do G1 fáze BC, dochází k defosforylaci a BRCA1 je specificky degradován v proteasomu (Choudhury et al., 2004). Významnou funkcí BRCA1 v jádře je odpověď na poškození DNA (DDR – „DNA damage response“). V důsledku poškození DNA

se množství BRCA1 v jádře dočasně zvyšuje během 2 – 6 hodin (Brodie and Henderson, 2010).

2.3.2 Cytoplasmatická lokalizace

Export proteinu BRCA1 a jeho lokalizace v cytoplasmě je spojena s indukcí apoptózy nezávislé na p53 (Harkin et al., 1999). Fosforylovaná forma BRCA1 byla identifikována v mitochondriích a v komplexu s anti-apoptickým proteinem Bcl-2, což poukazuje na regulaci apoptózy (Laulier et al., 2011). Během mitózy se hypofosforylovaný BRCA1 váže na γ -tubulin v centrosomu (Hsu and White, 1998; Hsu et al., 2001). Lokalizace BRCA1 na centrosomu je spojena s regulací BC (Henderson, 2012).

2.4 Interakce s BRCA1 vazebnými partnery

Multifunkčnost proteinu BRCA1 je dána především jeho výskytem v rozdílných multiproteinových komplexech. Dá se tedy říct, že interakce se specifickým vazebným partnerem podmiňuje funkci BRCA1.

Protein BRCA1 se přednostně vyskytuje jako heterodimer s proteinem BARD1. Vazba mezi těmito dvěma partnery je zprostředkována RING doménou. Tu ve své struktuře obsahuje jak BRCA1, tak BARD1. Vazba BARD1 k BRCA1 je stabilizována vytvořením hydrofobního prostředí mezi α helixy RING domén (Brzovic et al., 2001).

Interakce mezi těmito dvěma proteiny zvyšuje jejich stabilitu a zároveň i E3 ubikvitin ligázovou aktivitu (Xia et al., 2003). Díky interakci těchto dvou partnerů, dochází k maskování NES a heterodimer zůstává v jádře (Henderson, 2005). Interakce s BARD1 je také vyžadována pro potlačení transkripce během DDR (Kleiman et al., 2001).

Pokusy *in vitro* ukazují, že protein BARD1 se podílí na udržování genomové integrity. Nedostatek proteinu má negativní vliv na kontrolu BC. Dochází ke vzniku aneuploidních myších embryonálních buněk a k poškození embryonálního vývoje. Myši deficientní v genu *BRCA1* nebo *BARD1* se navzájem velmi podobají. Fenotyp těchto jedinců je také stejný jako fenotyp myši bez genu pro oba proteiny. Naopak BRCA1 a BARD1 nemají samostatně žádnou esenciální funkci. To znamená, že BARD1 se na udržování genomové integrity podílí pouze ve vazbě s BRCA1 a naopak (McCarthy et al., 2003).

2.5 BRCA1 komplexy

Na základě složení třech hlavních multiproteinových komplexů, ve kterých BRCA1 figuruje jako centrální platformní protein (Scully et al., 1999; Greenberg et al., 2006), byla navržena jejich klasifikace jako BRCA1-A (hlavní vazebný partner BRCA1 je Abraxas), B (BACH1) a C (CtIP) komplexy. Tyto komplexy se liší nejen svým složením a lokalizací, ale především funkcí. Změna struktury proteinu BRCA1, která by vedla k následné změně jeho vazebných vlastností, by tedy měla negativní vliv na skládání těchto multiproteinových komplexů a narušení buněčných procesů, na kterých se podílejí.

2.5.1 BRCA1-A komplex

BRCA1-A komplex se skládá z proteinu BRCA1, RAP80, MERIT40, BRCC36/45 a Abraxas. Komplex se na DSB váže prostřednictvím γ H2AX (Coleman and Greenberg, 2011). Cílení komplexu je závislé na Abraxas a proteinech s ním asociovanými – RAP80 a BRCC36/45 (Chen et al., 2006; Wang et al., 2007; Kim et al., 2007). BRCC36/45 přispívá ke správné aktivaci BRCA1 v místě DSB (Chen et al., 2006). Prostřednictvím BRCC36/45 se do komplexu váže MERIT40, který stabilizuje komplex v místě DSB (Feng et al., 2009). RAP80 je zodpovědný za inhibici resekce v místě DSB (Coleman and Greenberg, 2011).

Funkcí tohoto komplexu je udržování rovnováhy mezi hlavními mechanismy opravy poškozené DNA – homologní rekombinací (HR) a nehomologním spojováním volných konců (NHEJ). Na rozdíl od ostatních BRCA1 komplexů, je BRCA1-A komplex negativním regulátorem HR. Zabráněním přístupu nukleáz k poškozené DNA inhibuje resekci DNA v místě DSB. Při poškození BRCA1-A komplexu dochází k poškození rovnováhy mezi NHEJ a HR. Výsledkem je nestabilní genom. Důvodem je nahromadění poškození opravovaných pomalým procesem HR (Coleman and Greenberg, 2011). BRCA1-A komplex také přispívá k pozastavení BC v kontrolním bodě mezi G2 a M fázemi (Feng et al., 2009).

2.5.2 BRCA1-B komplex

BRCA1-B komplex se skládá z proteinu BRCA1, TopBP1 a BACH1. BACH1 se na BRCA1 váže přímo (Cantor et al., 2001). TopBP1 se ke komplexu váže prostřednictvím BACH1 (Gong et al., 2010).

Pokud je komplex kompletní, je při opravě DSB upřednostňována HR. Komplex podporuje HR díky helikázové aktivitě BACH1. Zpřístupňuje tím DNA pro resekci a tvorbu 3' ssDNA (Xie et al., 2012). Komplex se také podílí na replikaci v případě, že dojde k zastavení replikační vidlice v místě poškozené DNA (Gupta et al., 2005). Přítomnost komplexu B podporuje vazbu replikačního proteinu A (RPA) na ssDNA a aktivaci kontrolního bodu S-fáze BC (replikační kontrolní bod) (Gong et al., 2010). TopBP1 je stěžejní pro správnou aktivaci ATR (Cotta-Ramusino et al., 2011). Navíc je komplex vyžadován pro správnou fosforylaci proteinů prostřednictvím ATR (Gong et al., 2010).

2.5.3 BRCA1-C komplex

BRCA1-C komplex se skládá z proteinu BRCA1, proteinů Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN komplex) a CtIP (Greenberg et al., 2006). Vazba mezi BRCA1 a CtIP je závislá na fosforylaci CtIP (serin 327) (Yu and Chen, 2004). CtIP je aktivována (fosforylací na threoninu 847) během S a G2-fáze BC cyklin dependentními kinázami (Huertas and Jackson, 2009). CtIP stimuluje nukleázovou aktivitu MRN komplexu a dojde k odstranění části 5' sekvence na obou koncích DSB. BRCA1-C komplex je tedy zodpovědný za tvorbu 3' přesahujících ssDNA vláken v místě DSB. Na vzniklou ssDNA se váže RPA. CtIP také zajišťuje vazbu ATR do místa DSB (Sartori et al., 2007). Touto funkcí BRCA1-C komplex také přispívá k zastavení BC v S-fázi v závislosti na vzniku poškození DNA (Yu and Chen, 2004).

Bylo zjištěno, že aktivita CtIP v iniciaci tvorby 3' ssDNA nezávisí na BRCA1 (Polato et al., 2014). V nepřítomnosti BRCA1 se ale snižuje rychlost a zkracuje se délka odstraněné sekvence. BRCA1 zvyšuje účinnost BRCA1-C komplexu (Cruz-García et al., 2014). BRCA1 z DSB odstraňuje a brání vazbě proteinů iniciujících NHEJ. Tím BRCA1-C komplex pomáhá v S a G2-fázi BC upřednostnit pro opravu DSB HR (Escribano-Díaz et al., 2013).

2.6 Funkce BRCA1

2.6.1 Oprava poškozené DNA

Buňky jsou během svého života vystavovány vlivům vnějšího (UV, ionizující záření a různé chemikálie) a vnitřního (reaktivní kyslíkové radikály, spontánní deaminace) prostředí, které porušují integritu jejich genomů. Buňky na tato poškození odpovídají aktivací nejrozličnějších signálních drah, které vyústí v pozastavení buněčného cyklu a aktivaci opravy poškození DNA. Celkově se kaskáda těchto dějů označuje jako DDR („DNA damage response“) (O'Donovan and Livingston, 2010; Maréchal and Zou, 2013).

Nejnebezpečnějším typem poškození DNA je dvouřetězcový zlom. Může k němu dojít zcela přirozeně, například při V(D)J rekombinaci, nebo crossing-overu v meióze. DSB vznikají také vlivem vnějšího genotoxického stresu, nebo ionizujícím zářením. Vzhledem k současnému poškození obou vláken DNA není přítomno intaktní vlákno, které by mohlo sloužit jako templát pro správnou opravu. Takové poškození bývá opraveno jedním ze dvou hlavních způsobů: NHEJ nebo HR. Výběr opravného mechanismu závisí zejména na fázi BC, ve které k poškození dojde. Selhání opravy poškozené DNA vede ke smrti buňky. Špatná oprava může mít za následek mutace a přestavby chromosomů, jejichž nahromadění vede ke karcinogenezi (O'Donovan and Livingston, 2010). Na opravách DSB se podílí mnoho proteinů. BRCA1 při opravách DNA funguje jako proteinová platforma, díky které se do místa DSB mohou vázat další proteiny (Scully et al., 1999). BRCA1 se účastní jak HR, tak NHEJ (O'Donovan and Livingston, 2010; Daley and Sung, 2014).

2.6.1.1 Homologní rekombinace

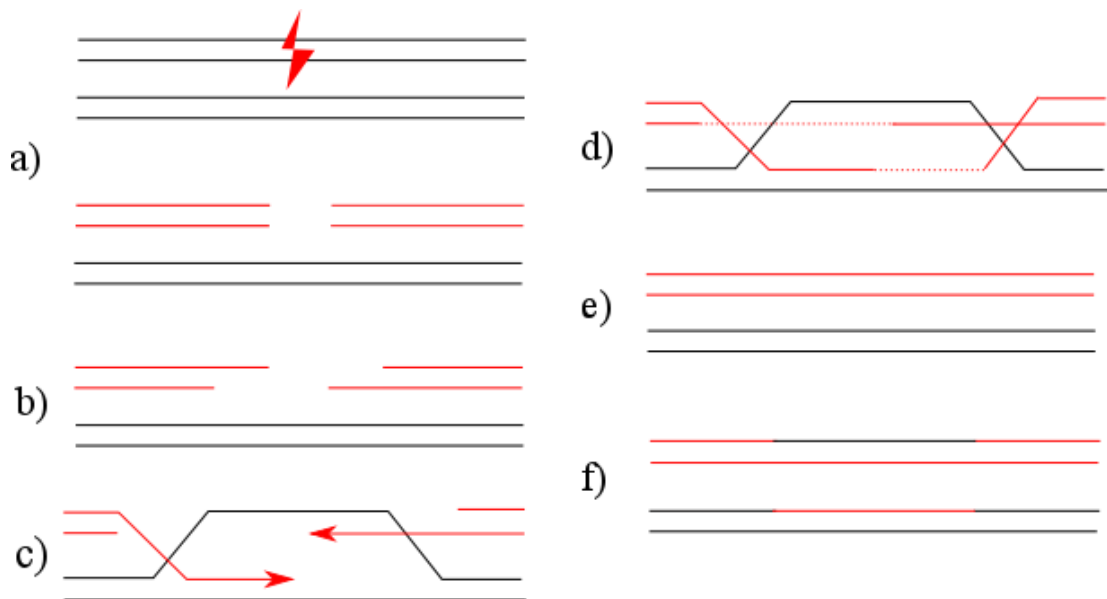
Homologní rekombinace je reparačním mechanismem, který převládá v pozdní S a G2 fázi BC, kdy jako templát pro opravu slouží sesterská chromatida (Wilson et al., 2010). Vzhledem k použití sesterské chromatidy jako templátu opravy v relativně dlouhých homologních úsecích, je HR označována jako bezchybný proces (Obr. IV).

Homologní rekombinace je koordinovaná hierarchickou vazbou účastníků se proteinů. DSB je rozeznán komplexem proteinů Mre11 – Rad50 – Nbs1 (MRN komplex), který udržuje konce poškozené DNA v blízkosti. MRN komplex váže a aktivuje ATM kinázu (Uziel et al., 2003).

Seskupování proteinů v místě DSB je závislé na fosforylaci histonu H2AX v místě poškození (Paull et al., 1999). H2AX je fosforylován na specifickém místě (lysin 139) aktivovanými ATM a ATR kinázami v odpovědi na vznik DSB a vzniká tak γ H2AX. (Rogakou et al., 1998). γ H2AX je následně rozpoznán proteinem MDC1 („Mediator of DNA damage checkpoint protein 1“), který se do místa DSB váže právě prostřednictvím γ H2AX a ATM. Přítomnost MDC1 spouští šíření signálu (fosforylace H2AX) po histonech v okolí DSB (Lou et al., 2006).

Následuje přepnutí signálu z fosforylace na ubikvitinaci. Na MDC1 se váže E3 ubikvitin ligáza RNF8, která ubikvitinuje γ H2AX histony v okolí DSB na lysinu 63

(Mailand et al., 2007, Plans et al., 2006). Na ubikvitinované histony se váže další E3 ubikvitin ligáza, která signál amplifikuje. Ubikvitinový signál je rozpoznán BRCA1-A komplexem (Mailand et al., 2007; Doil et al., 2009), který se spolu s BRCA1-C komplexem podílí na rozsáhlé resekci volných konců poškozeného chromosomu (Obr. IVb). Takto vzniklé jednořetězcové přesahy jsou stabilizovány pomocí RPA proteinu. Ten je v další fázi HR nahrazen Rad51, který se ssDNA tvoří tzv. nukleoproteinový filament (Yu et al., 2001). Homologní rekombinace spočívá v invazi tohoto nukleoproteinového filamentu do intaktní sesterské chromatidy (Sung and Robberson, 1995). Po nalezení komplementární sekvence na sesterské chromatidě, dochází ke tvorbě D-vlášeny (Obr. IVc). Oba 3' ssDNA konce poškozené DNA s komplementární sekvencí hybridizují a slouží jako primery pro syntézu DNA (Obr. IVd). Po dokončení opravy dochází ke tvorbě Hollidayovy struktury (Obr. IVe) (Schwacha and Kleckner, 1994; O'Donovan and Livingston, 2010), která je v konečné fázi rozrušena a konce DNA jsou spojeny (Svendsen et al., 2009). Podle směru rozrušení Hollidayovy struktury dochází ke crossing-overu (Obr. IVf) nebo k obnovení původní chromatidy (Obr. IVg). Crossing-over je ale v HR velmi vzácný (Johnson and Jasin, 2000).



Obr. IV: Homologní rekombinace. Po indukci dvouřetězcového zlomu (**a**) dochází k resekci volných konců poškozené DNA (**b**), invazi nukleoproteinového filamentu do sesterské chromatidy vzniká D-vlášenska (**c**), opravou DNA podle sesterské chromatidy a vzniká Hollidayova struktura (**d**), k přerušování struktury dochází k obnovení původní chromatidy (častější) (**e**) nebo ke crossing-overu (**f**).

2.6.1.2 Nehomologní spojování volných konců

Primárním mechanismem opravy DSB u vyšších eukaryot je NHEJ (Takata et al., 1998). Při tomto procesu je poškozené místo chromosomu rozeznáno a vázáno heterodimerem proteinů Ku70-Ku80 (Cary et al., 1997). Na takto vzniklý sensorický komplex se do místa poškození váže katalytická podjednotka DNA-dependentní kinázy (DNA-PK_{CS}) (Gottlieb and Jackson, 1993). Interakcí DNA-PK_{CS} na obou koncích zlomu dojde k přiblížení obou konců DNA, čímž dojde k aktivaci kinázového komplexu (DeFazio et al., 2002) a spojení obou volných konců DNA ligázou IV. DNA ligáza IV se do místa poškození váže v proteinovém komplexu (Lieber et al., 1997).

V místě DSB dochází k poškození bází. Proto před spojením konců DNA musí dojít k úpravě těchto poškozených bází. Poškozené báze jsou odstraněny proteinem Artemis, který se do místa DSB váže díky DNA-PK_{CS} (Moshous et al., 2001; Ma et al., 2002). Odstraněním poškozených bází vznikají na koncích DNA přesahy a mezery, které jsou zaplněny specifickou polymerázou. Výsledkem tohoto procesu může být ztráta sekvence a proto je NHEJ označován jako chybový. K úpravě konců DNA v místě poškození ale není vyžadováno vždy (Guirouilh-Barbat et al., 2007). Místa poškození, která jsou opravena pomocí NHEJ, tedy můžou, ale nemusí po opravě obsahovat mutaci.

Existuje ještě další způsob spojování nehomologních konců, alternativní NHEJ (alt-NHEJ), jehož výsledkem je vždy mutace v opravované sekvenci (Feldmann et al., 2000; Yan et al., 2007). K alt-NHEJ přistupuje buňka v případě, že není sekvenci možné opravit klasickým NHEJ (Yu and Gabriel, 2003). V blízkosti opravované sekvence dochází k hledání mikrohomiologií, na jejichž základě může dojít ke spojení konců. Při hledání mikrohomiologií v rámci opravy alt-NHEJ se uplatňuje nukleázová aktivita komplexu MRN (Rass et al., 2009). Alt-NHEJ je také nezávislý na heterodimeru Ku80-Ku70. Naopak je tomu u klasického c-NHEJ, jehož průběh je závislý na vazbě heterodimeru Ku70-Ku80 k místu DSB (Jiang et al., 2013). Heterodimer je k místu u DSB vázán a stabilizován díky BRCA1. V průběhu G1 fáze BC BRCA1 v místě DSB preferenčně váže heterodimer Ku70-Ku80 a tím podporuje c-NHEJ. Alt-NHEJ je BRCA1 inhibován (Dohrn et al., 2012). Během S a G2 fáze BC se ale afinita BRCA1 mění a dochází k formování komplexů zodpovědných za HR (Chen et al., 2008; Jiang et al., 2013).

2.6.2 Regulace centrosomu

V cytoplasmě BRCA1 reguluje duplikaci centrosomu, který je základem mitotického vřeténka a vzniká polymerizací tubulinu (Moritz et al., 1995). Ve struktuře BRCA1 byly objeveny dvě oblasti schopné vazby ke γ -tubulinu (Hsu et al., 2001; Tarapore et al., 2012). Ty ale pro vazbu BRCA1 k centriolu nejsou esenciální, protože pro vazbu postačuje kombinace N a C-terminálních sekvencí proteinu (Brodie and Henderson, 2012). BRCA1 prostřednictvím ubikvitinace γ -tubulinu negativně ovlivňuje funkci centrosomu jako iniciátoru polymerizace mikrotubulů (Sankaran et al., 2005). Ubikvitinace γ -tubulinu také inhibuje duplikaci centrosomu. Pro funkci regulace duplikace centrosomu ale BRCA1 vyžaduje svého vazebného partnera BARD1 (Starita et al., 2004). BRCA1 je k centrosomu dopravován samostatně. K sestavení heterodimeru BRCA1-BARD1 dochází až na centriolu (Brodie and Henderson, 2012).

Prostřednictvím BRCA1 se na centrosom váží další proteiny zapojené do kontroly BC. Pokud nejsou mitotické mikrotubuly správně navázány na chromosomy, dochází k inhibici komplexu podporujícího anafázi (Wang et al., 2004). E3 ubikvitin ligázová aktivita heterodimeru BRCA1-BARD se také uplatňuje při sestavování mitotického vřeténka (Joukov et al., 2006).

2.6.3 Apoptóza

Export proteinu BRCA1 z jádra a jeho akumulace v cytoplasmě je spojována s indukcí a regulací programované buněčné smrti (Fabbro et al., 2004). Ke smrti buňky nestačí pouze neúspěšná oprava poškozené DNA nebo ztráta funkce BRCA1 v opravě DNA. Musí také dojít k exportu BRCA1 z jádra. Export BRCA1 a jeho nahromadění v cytoplasmě je následek neúspěšného opravení poškozené DNA a to nejen mechanismem HR, ale například i nukleotidovou excisní opravou. BRCA1 aktivuje apoptózu pomocí vnitřní signální dráhy, kdy dochází ke štěpení a aktivaci kaspázy 9 (Wang et al., 2010). Inhibitorem BRCA1 indukované apoptózy je BARD1. Pro export BRCA1 z jádra musí dojít k disociaci komplexu BRCA1-BARD1 a odkrytí NES (Fabbro et al., 2004). Cytosolická lokalizace BRCA1 může tedy spojovat neúspěšnou opravu poškozené DNA a následnou indukci apoptózy (Wang et al., 2010).

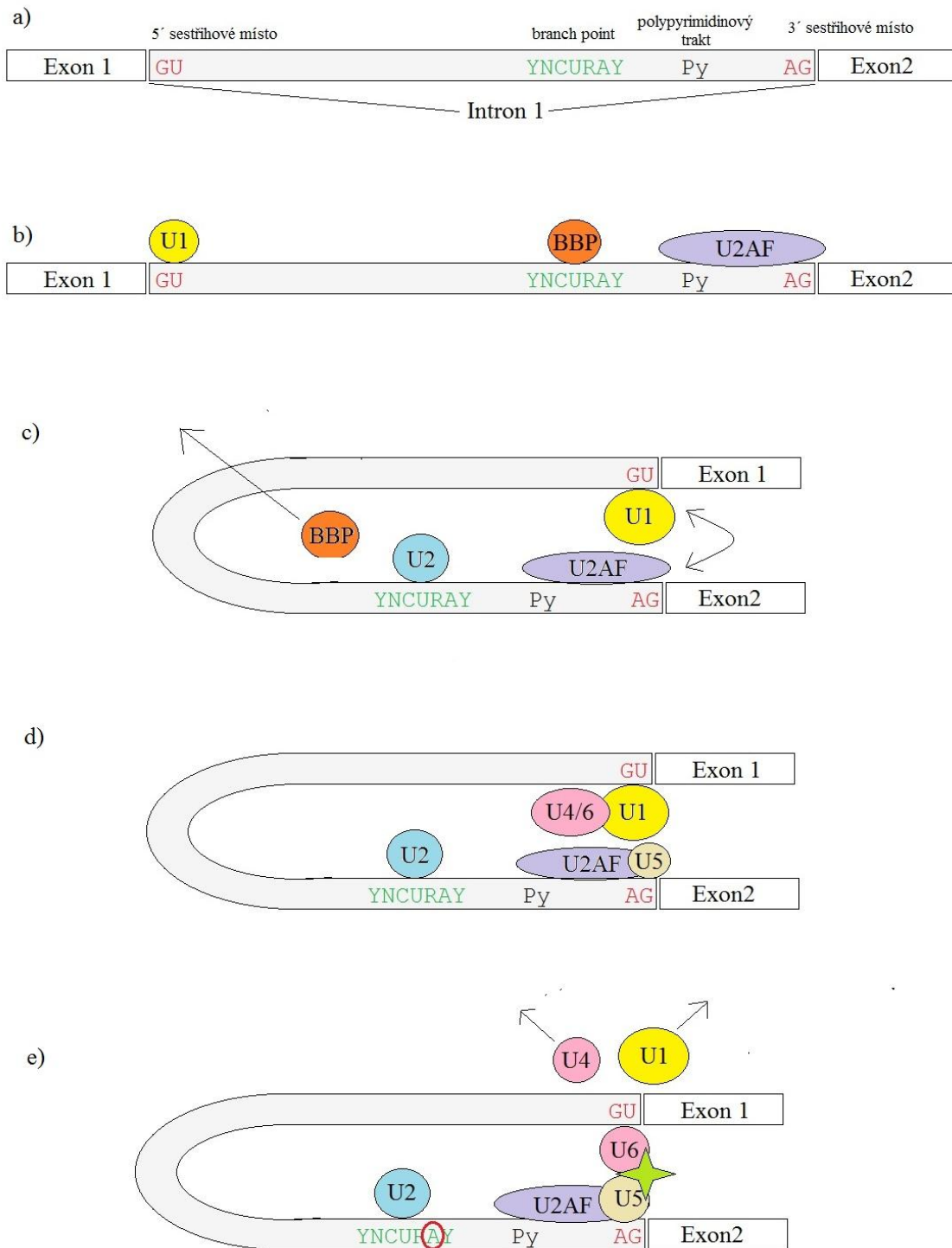
2.7 Alternativní sestřih

V lidském genomu se nachází asi 20 000 protein-kódujících sekvencí, které po přepisu do prekurzorové mRNA (pre-mRNA) podléhají post-transkripčním změnám – sestřihu pre-mRNA. Konstitutivním sestřihem vznikají zralé mRNA v celé délce kódující sekvence odpovídajícího genu. Alternativním pre-mRNA sestřihem (AS) vznikají transkripty lišící se od kódující sekvence. Předpokládá se, že alternativnímu pre-mRNA sestřihu podléhá více než polovina genů lidského genomu (Lander et al., 2001). Díky AS vzniká velké množství transkriptů (zralých mRNA) z malého množství genů (Cáceres and Kornblihtt, 2002). Alternativní sestřih je tedy z velké míry zodpovědný za proteinovou diverzitu. Díky změně kódující sekvence genů a následné struktuře proteinového produktu mohou díky AS vznikat proteinové izoformy s velmi odlišnými biologickými vlastnostmi a tedy i funkcí. Bylo zjištěno, že vznik různých sestřihových variant jednoho genu může být tkáňově specifický (Wang et al., 2008). Vlivem AS může rovněž docházet ke změně čtecího rámce (Clark and Thanaraj, 2002). Pokud při tom vznikne předčasný terminační kodon, jsou příslušné molekuly mRNA rozpoznávány a specificky degradovány procesem „non-sense mediated decay“ (NMD). Alternativní sestřih byl rovněž prokázán v nekódujících oblastech některých genů s významným dopadem na regulaci exprese (Matlin et al., 2005). Vzhledem k těmto skutečnostem je AS jedním z velmi důležitých kroků regulace genové exprese a je velmi přesně regulován.

Funkční jednotkou sestřihu je spliceosom. Spliceosom se skládá z malých jaderných ribonukleoproteinových jednotek U1, U2, U5 a U4/U6 (snRNP) a dalších sestřihových faktorů (Obr. V) (Cáceres and Kornblihtt, 2002). Pro formování spliceosomu jsou důležitá vysoce konzervovaná sestřihová místa nacházející se na 5' (GU) a 3' (AG) koncích intronů, „branch point“ a poly-pyrimidinový trakt nacházející se taktéž v sekvenci intronů (Obr. Va). Pro katalytickou aktivitu spliceosomu je důležitý adenin obsažený v sekvenci „branch pointu“, která je YNCURAY (Y = pyrimidin, R = purin, N = nukleotid) (Obr Va) (Moore et al., 1993). Skládání spliceosomu probíhá formováním několika komplexů (Obr Vb – e).

Ko-transkripčně se na nově vznikající pre-mRNA váží heterogenní jaderné ribonukleoproteiny (hnRNP) a sestřihové faktory, které tvoří H komplex. Následně dochází k rozpoznání 5' sestřihového místa podjednotkou U1, branch point rozpoznává „branch point“ vazebný protein (BBP – „branch point binding protein“) a polypyrimidinový trakt a 3' sestřihové místo rozpoznává protein U2AF. Pokud jsou přítomny zesilovače sestřihu,

tak dochází k jejich rozpoznání pomocí na serin bohatých (SR – „serine-rich“) proteinů (Shen et al., 2004). Takto vzniká E komplex (Obr. Vb). Vazbou podjednotky U2 na „branch point“ a disociací BBP vzniká A komplex (Obr. Vc). V rámci A a E komplexů dochází interakcemi mezi U1 snRNP a U2AF k přiblížení 5' a 3' sestřihových míst (Obr. Vc). Vazbou podjednotky U5 na 3' sestřihové místo a podjednotky U4/U6 na 5' sestřihové místo vzniká B komplex (Obr. Vd). Katalyticky aktivní C komplex poté vzniká disociací podjednotky U1 a U4 a vazbou přídatných sestřihových faktorů (Obr. Ve). Prostorové změny v rámci C komplexu umožní první transesterifikační reakci mezi 5' sestřihovým místem a 2' hydroxylem adeninu obsaženého v sekvenci „branch pointu“ (Obr. Ve). Vzniklý 3' hydroxyl na posledním nukleotidu prvního exonu umožňuje druhou transesterifikační reakci. Dojde ke spojení exonů a vyštěpení intronu (Matlin et al., 2005; Smith and. Valcárcel, 2000).



Obr. V: Spliceosom. Sekvence důležité pro sestavování spliceosomu (a); E komplex: U1 snRNP se váže k 5' sestríhovému místu, BBP se váže k branch pointu, U2AF se váže k polypyrimidinovému traktu a k 3' sestríhovému místu (b); A komplex: U2 snRNP se váže k branch pointu a BBP disociuje, dochází k přiblížení 5' a 3' sestríhového místa (c); B komplex: U4/6 snRNP se váže na 5' sestríhové místo, U5 se váže na 3' sestríhové místo (d); C komplex – enzymaticky aktivní spliceosom: vazba mezi podjednotkami (zelená hvězda), první transesterifikační reakce je zprostředkována adeninem v sekvenci branch pointu (zakroužkováno červeně) (e).

Sestřih vyžaduje také řadu sestřihových faktorů a regulátorů. Primární pre-mRNA interagují s rozmanitou skupinou jaderných proteinů (hnRNP – „heterogenous nuclear ribonucleoprotein“) a tvoří ribonukleoproteinový komplex (hRNP komplex). Jednotlivé hnRNP mají individuální sekvenční specifitu (Krecic and Swanson, 1999). Tvorba hnRNP komplexu má za následek sbalování pre-mRNA a určování jejího osudu (Smith and Valcárcel, 2000). Takovéto sbalování pre-mRNA ovlivňuje sestřih přiblížením vzdálených exonů a párováním vzdálených sestřihových míst (Blanchette and Chabot, 1999).

Alternativní sestřih oproti konstitutivnímu sestřihu využívá i odlišná sestřihová místa. Regulace sestřihu a výběr sestřihového místa závisí na specifických sekvencích umístěných v exonech. Jsou to zesilovače nebo zeslabovače sestřihu, které jsou rozpoznávány obecnými sestřihovými faktory (GSF – „general splicing factors“). Rozdíly v koncentraci GSF vedou ke změnám ve výběru sestřihových míst (Cáceres et al., 1994).

Pozitivně sestřih regulují zesilovače – enhancery (ESE – „exon splicing enhancers“). K sekvencím ESE se váží proteiny rodiny SR. Vazba SR proteinů k ESE je nezbytná pro tvorbu spliceosomu a výběr sestřihového místa (Cáceres et al., 1994). SR proteiny jsou konzervované proteiny, skládající se z jednoho nebo dvou RNA-rozpoznávajících motivů (RRM) a C-terminální (RS) domény. RRM doména se váže na ESE a rekrutuje další proteiny spliceosomu (snRNP), které se váží na RS doménu (Wu and Maniatis, 1993; Kohtz et al., 1994). Svou úlohu ve formování spliceosomu hrají také proteiny příbuzné SR proteinům („SR-related“). Mezi „SR-related“ proteiny řadíme snRNP U1 a U2AF (Cáceres and Kornblihtt, 2002).

Negativně sestřih regulující zeslabovače – silencery (ESS – „exon splicing silencer“) jsou rozpoznávány hnRNP. Vazba hnRNP na ESS maskuje blízká sestřihová místa, která nemohou být využita pro sestřih (Cáceres and Kornblihtt, 2002).

2.7.1 Regulační úloha alternativního sestřihu

Alternativní pre-mRNA sestřih hraje regulační úlohy v řadě buněčných procesů. Nejlépe je tato skutečnost zdokumentována na genu Bcl-2, který se v řadě buněk přirozeně exprimují ve dvou AS izoformách. Ty jsou označovány jako „long“ – Bcl-xl a „short“ – Bcl-xs. Biologická aktivita obou těchto variant je naprosto odlišná. Zatímco Bcl-xs má silně pro-apoptické účinky, izoforma Bcl-xl je naopak antiapoptická.

O výsledné aktivitě produktu exprese genu Bcl-2 rozhoduje převažující koncentrace jednotlivých AS variant (Boise et al., 1993). Dá se předpokládat, že podobný mechanismus je uplatňován i při regulaci biologické aktivity řady jiných genů. V takovém případě, by každý aberantní zásah do regulace AS měl za následek narušení příslušného biologického procesu. Pokud by se to týkalo tumor supresorových genů, nebo proto-onkogenů, mohla by deregulace alternativního pre-mRNA sestřihu být jedním z faktorů, který je zodpovědný, nebo se podílí, na procesu maligní transformace.

2.7.2 Alternativní sestřih *BRCA1*

U jedinců nesoucích mutaci genu *BRCA1* v zárodečných buňkách se vyskytuje hereditární forma karcinomu prsu a ovarií (Orban and Olah, 2003). Proto by se dalo předpokládat, že pacienti se sporadicky vznikajícími karcinomy nesou mutace genu ve svých somatických buňkách. Ovšem studie soustřeďující se na sporadické karcinomy prsu a ovarií odhalily, že mutace genu *BRCA1* v somatických buňkách jsou velmi vzácné (Russell et al., 2000; Van Der Looij et al., 2000). Vznik sporadických karcinomů častěji vyvolávají změny v regulaci genové exprese (Di et al., 2010). Ve vzorcích tumorů prsní tkáně se objevují AS varianty genu *BRCA1* ve změněném množství oproti zdravé tkáni. U nemocných pacientů se také vyskytují AS varianty bez známých funkcí. Tyto odchylky jsou způsobovány změnami na úrovni regulace alternativního sestřihu – mutace v regulačních sekvencích nebo změna zastoupení regulačních proteinů (Schwartz et al., 2008). V případě karcinomu prsu se ale zdá, že mutace v sestřihových místech se objevují velmi zřídka (Romero et al., 2015).

Do dnešní doby bylo v krevních vzorcích a rovněž ve vzorcích prsní tkáně objeveno 63 sestřihových variant genu *BRCA1* (Colombo et al., 2014; Romero et al., 2015). Většina těchto alternativních sestřihových variant představuje z kvantitativního hlediska minoritní část celkového transkriptu. Ve vyšších koncentracích se ve tkáních vyskytují tři varianty – $\Delta 8,9$ (postrádající exon 8 a 9), $\Delta 10q$ (postrádající část exonu 10) a $\Delta 8,9,10q$ (postrádající exon 8, 9 a část exonu 10) – které jsou označovány jako pre-dominantní (Colombo et al., 2014), což znamená, že tvoří více než 10 % celkového transkriptu genu *BRCA1*. Na rozdíl od vzorků tkání zdravých jedinců, bylo ve vzorcích nádorové tkáně identifikováno 27 pre-dominantních sestřihových variant. Přitom nebyly potvrzeny žádné AS varianty genu *BRCA1*, které by byly exprimovány výhradně v prsní tkáni (Romero et al., 2015). Změna regulace exprese a množství pre-dominantních AS variant je také spojená s karcinogenezí (Orban and Olah, 2003).

Sestřihové varianty genu *BRCA1* lze podle funkce rozdělit do dvou skupin – inaktivujících a jiných. Do skupiny inaktivujících mRNA AS variant se řadí ty, které translaci neposkytují funkční protein. Patří sem také varianty, v jejichž sekvenci vzniká předčasný STOP kodon a jsou degradovány prostřednictvím NMD. Dále varianty, u nichž sestřih postihuje důležité proteinové domény (BRCT a RING domény). Do kategorie jiných se řadí AS varianty zachovávající původní čtecí rámec a varianty modifikující nepřekládaná místa mRNA (Romero et al., 2015).

Vzhledem k velikosti exonu 10 se dá očekávat, že AS varianty $\Delta 10q$ nebo $\Delta 10$, se budou v porovnání s funkcí „full-length“ proteinu lišit nejvíce (Orban and Olah, 2003). Pre-dominantní AS varianta $\Delta 10q$ vzniká výběrem 5' sestřihového místa nacházejícího se v sekvenci exonu 10. Výsledný protein postrádá oba NLS. Do jádra může být izoforma $\Delta 10q$ importována pomocí jiné, alternativní, dráhy. Pokud ale není možný jaderný import ani pomocí alternativní dráhy, stává se protein výhradně cytoplasmatickým (Qin et al., 2011). V závislosti na své lokalizaci má tato izoforma vliv na proliferaci buněk prsní tkáně a potenciálně i na maligní transformaci. Cytoplasmatická forma proteinu podporuje proliferaci buněk. Naopak nadprodukce zvyšuje množství jaderné formy proteinu, která indukuje apoptózu (Maniccia et al., 2009). V přítomnosti „wild-type“ (wt) p53 je totiž varianta $\Delta 10$ i $\Delta 8,9,10q$ schopna transaktivovat promotor genu *p21* (Lu and Arrick, 2000). Velmi podobně se chová varianta $\Delta 10$, která postrádá celý exon 10. Studie na myších modelech odhalily, že nadprodukce (over-exprese) $\Delta 10$ je spojená s indukcí apoptózy (Bachelier et al., 2002). Naopak absence této varianty je spojená s abnormalitami, hromaděním poškozené buňky a vznikem tumorů (Kim et al., 2006).

3 Materiál a metody

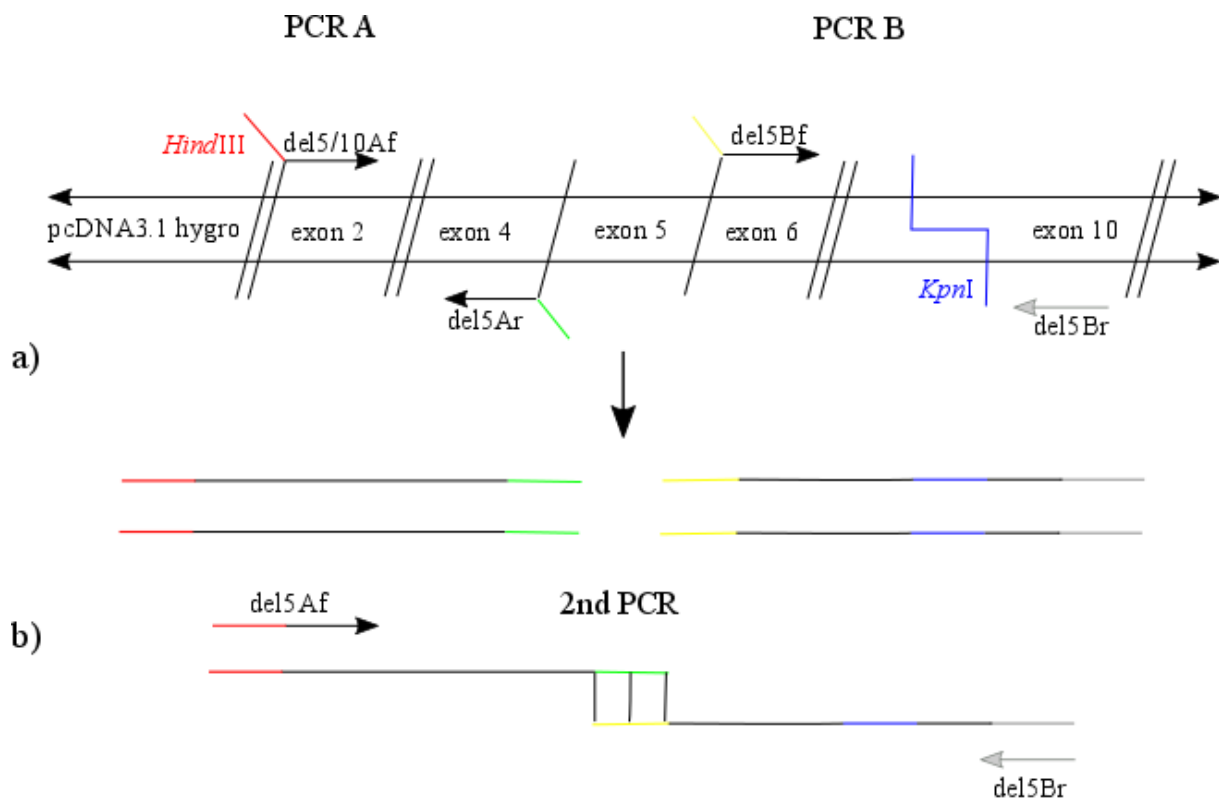
3.1 Příprava expresních vektorů

V prvním kroku přípravy expresních vektorů byly připraveny kódující sekvence alternativních sestřihových variant, které se liší od přirozené kódující sekvence genu *BRCA1* (*wtBRCA1*). Tyto sekvence poté byly zaklonovány do expresních vektorů pcDNA3.1 Hygro (Invitrogen) a pm-Cherry-C1 (Clontech). Takto připravené konstrukty byly transformovány do buněk. Dále byly vybrány pozitivní kolonie buněk, které byly sekvenovány.

3.1.1 Příprava AS variant

Pro přípravu AS variant s delecí exonu 5 (*BRCA1Δ5*) a exonu 10 (*BRCA1Δ10*) byla použita metoda sestřihové PCR (Obr. VI a VII), kdy byl jako templát pro reakci použit vektor pcDNA3.1 Hygro se zaklonovanou kódující sekvencí genu *BRCA1* (*pcDNA3.1-wtBRCA1*), který byl poskytnut prof. Harkinem (Quinn et al., 2003).

Postup metody PCR sestřihu pomocí níž byla vytvořena AS varianta *BRCA1Δ5* je znázorněn na obrázku VI. Byly navrženy dvě sady primerů pro PCR A (*del5/10Af*, *del5Ar*) a B (*del5Bf*, *del5Br*) (Tab. I). Při přípravě varianty *BRCA1Δ5* byla amplifikována celá kódující sekvence genu *BRCA1* před exonem 5. Kódující sekvence za exonem 5 byla amplifikována asi do poloviny exonu 10 za restriční místo pro enzym *KpnI* (New England Biolabs).

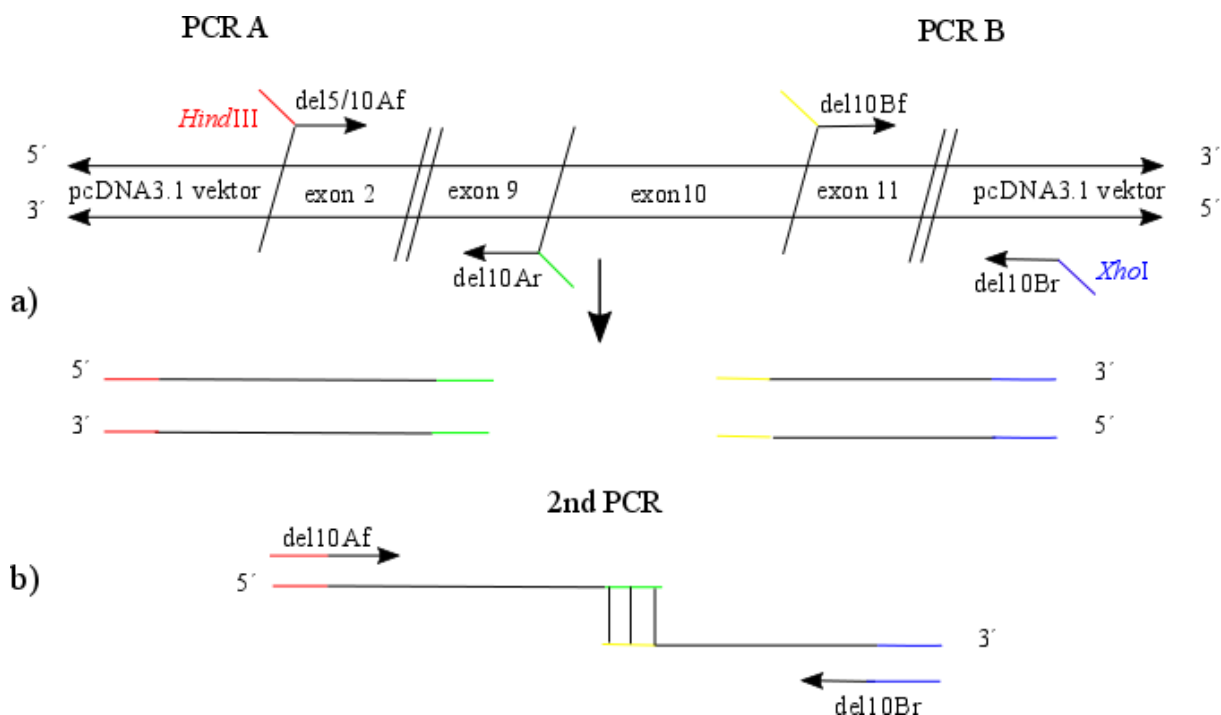


Obr. VI: PCR sestřih pro AS variantu BRCA1Δ5. Pro přípravu alternativní sestřihové varianty BRCA1Δ5 byla použita metoda sestřihové PCR. V prvním kroku (a) byly amplifikovány dva úseky DNA obklopující deletovaný exon 5. Byly použity dvě sady primerů (PCR A, PCR B). Vnitřní primery (del5Ar a del5Bf) byly částečně komplementární. Vnější primer del5/10Af obsahoval ve své „flanking“ sekvenci restrikční místo pro restrikční endonukleázu HindIII. Vnější primer del5Br nasedal do druhé poloviny exonu 10 za restrikční místo pro enzym KpnI. Ve druhém kroku (b) (2nd PCR) byly vzniklé sekvence spojeny na základě homologních úseků. Byly použity vnější primery z reakcí A a B.

Tab I: Sekvence primerů pro PCR sestřih.

Název primeru	Sekvence primeru
del5/10Af	5' – CAAGCTTGACCTGGATTTATCTGCTC – 3'
del5Ar	5' – CGTACTTTCTTGTAGGCTCTTGCAAAATATGTCACTGG – 3'
del5Bf	5' – CCAGTGACATATTTTGCAAGAGCCTACAAGAAAGTACG – 3'
del5Br	5' – CCCAATGGATACTTAAAGCCTTCTG – 3'

Postup metody sestřihové PCR pomocí níž byla vytvořena AS varianta BRCA1 Δ 10 je znázorněna na obrázku VII. Opět byly navrženy dvě sady primerů pro PCR A (del5/10Af, del10Ar) a B (del10Bf, del10Br) (Tab II.). Při přípravě BRCA1 Δ 10 byla amplifikována celá kódující sekvence před i za exonem 10.



Obr VII: PCR sestřih pro AS variantu BRCA1 Δ 10. Pro přípravu alternativní sestřihové varianty BRCA1 Δ 10 byla použita metoda sestřihové PCR. V prvním kroku (a) byly amplifikovány dva úseky DNA obklopující deletovaný exon 10. Byly použity dvě sady primerů (PCR A, PCR B), kdy vnitřní primery (del10Ar a del10Bf) byly částečně komplementární a vnější primery (del5/10Af a del10Br) obsahovaly ve své „flanking“ sekvenci restrikční místa pro enzymy HindIII a XhoI. Ve druhém kroku (b) (2nd PCR) byly vzniklé sekvence spojeny na základě homologních úseků. Byly použity vnější primery z reakcí A a B.

Tab. II. Sekvence primerů pro PCR sestřih BRCA1 Δ 10.

Název primeru	Sekvence primeru
del5/10Af	5' – CAAGCTTGACCTGGATTTATCTGCTC – 3'
del10Ar	5' – CCCAGATGCTGCTTCACCCTTTTTTGCAG – 3'
del10Bf	5' – CTGCAAAAAAGGGTGAAGCAGCATCTGGG – 3'
del10Br	5' – GACCTCGAGCAGTCAGTAGTGGCTG – 3'

V prvním kroku PCR sestřihu bylo do reakční směsi napipetováno 5 μ l 10krát koncentrovaného (10x) TaKaRa La Taq pufru (Clontech), 8 μ l směsi deoxy-ribonukleotid trifosfátů (dNTP's), 1 μ l primeru 1, 1 μ l primeru 2, 0,2 μ l TaKaRa La Taq polymerázy (Clontech), 0,5 μ l templátu (pcDNA3.1-wtBRCA1 – 200 ng) a reakce byla doplněna do 50 μ l deionizovanou vodou (dH₂O). Po promíchání reakčních směsí a stočení na stolní centrifuze (Sigma) následovala amplifikace. Počáteční denaturace probíhala 45 sekund při 95 °C. Dále bylo využito dvou cyklů. V prvním cyklu bylo využito tzv. touch-down PCR, kdy při každém opakování cyklu dochází ke snížení teploty, při které dochází k neseďání primerů. První cyklus – 30 sekund (sec) při 95 °C, 30 sec při 68 až 52 °C a 3 minuty (min) a 20 sec při 68 °C – probíhal 16krát. Druhý cyklus – 30 sec při 95°C, 30 sec při 56 °C 3 min a 20 sec při 68 °C – probíhal 12krát. Konečná elongace probíhala 10 min při 72 °C. PCR A a B probíhaly v oddělených reakcích.

Vzniklé PCR fragmenty byly přečištěny pomocí elektroforetické separace. Fragmenty byly nanесeny na 0,7% agarózový gel a dělení podle molekulové hmotnosti probíhalo 40 minut při 90 V. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit O'Gene ruller DNA ladder mix (Fermentas). Bandy s odpovídající velikostí byly vyizolovány pomocí Zymoclean Gel DNA Recovery kitu (Zymo Research).

Ve druhém kroku PCR sestřihu (2nd PCR) došlo ke spojení sekvencí vzniklých PCR A a PCR B (Obr. VIb a VIIb). Jako primery byly použity forverdové primery z PCR A a reverzní primery z PCR B (Tab. I a II). Jako pozitivní kontrola byly použity fragmenty z PCR A a B.

Do reakce bylo napipetováno 5 μ l 10x TaKaRa La Taq pufru, 8 μ l dNTP's, 1 μ l primeru 1, 1 μ l primeru 2, 0,2 μ l TaKaRa La Taq polymerázy. Z PCR A a B bylo do reakce napipetováno tolik, aby reakce obsahovala 200 ng z PCR A i B. Celá reakce byla doplněna do 50 μ l dH₂O. Po promíchání a stočení zkumavky probíhala amplifikace. Počáteční denaturace probíhala 45 sec při 95 °C. Cyklus – 30 sec při 95 °C, 20 sec při 58 °C, 5 min při 68 °C – se opakoval 22krát. Konečná elongace probíhala 15 min při 68 °C.

PCR produkt po 2nd PCR byl přečištěn pomocí agarózové elektroforézy (0,7%). Elektroforéza probíhala 40 minut při 90 V. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit O'Gene ruller DNA ladder mix. Bandy odpovídající velikosti AS variant byly vyizolovány

pomocí Zymoclean Gel DNA Recovery kytu. Po izolaci byly změřeny koncentrace AS variant ve vzorcích.

Výsledná sestřihová varianta BRCA1 Δ 5 obsahovala na 5' konci restrikční místo pro enzym *Hind*III a na 3' konci restrikční místo pro enzym *Kpn*I. Sestřihová varianta BRCA1 Δ 10 obsahovala na 3' konci restrikční místo pro enzym *Hind*III a na 5' konci restrikční místo pro enzym *Xho*I. Tato restrikční místa umožňovala ligaci do expresních vektorů.

3.1.2 Ligace

Přečištěné PCR produkty byly nejprve zaligovány do klonovacího vektoru pCR2.1 (Invitrogen). Důvodem byla nízká koncentrace PCR produktů po přečištění. Ligace do vektoru pCR2.1 nevyžaduje ošetření PCR produktů restrikčními endonukleázami, kdy by mohlo po dalším přečištění dojít ke dalšímu snížení koncentrace. Vektor pCR2.1 nesoucí AS varianty tedy sloužil jako zásobní zdroj AS variant.

Vektor pCR2.1 obsahuje pro selekci pozitivních klonů *lacZ* operon a rezistenci pro ampicilin nebo kanamycin. V našem případě bylo využito rezistence k ampicilinu (Sigma Aldrich). Pro ligaci do vektoru byl použit TA cloning kit (Invitrogen). Po transfekci byly vybrány pozitivní klony buněk a konstrukty v buňkách byly osekvenovány. Klony nesoucí námi požadované konstrukty byly použity jako zdroj insertu pro ligaci do vektoru pcDNA3.1 Hygro.

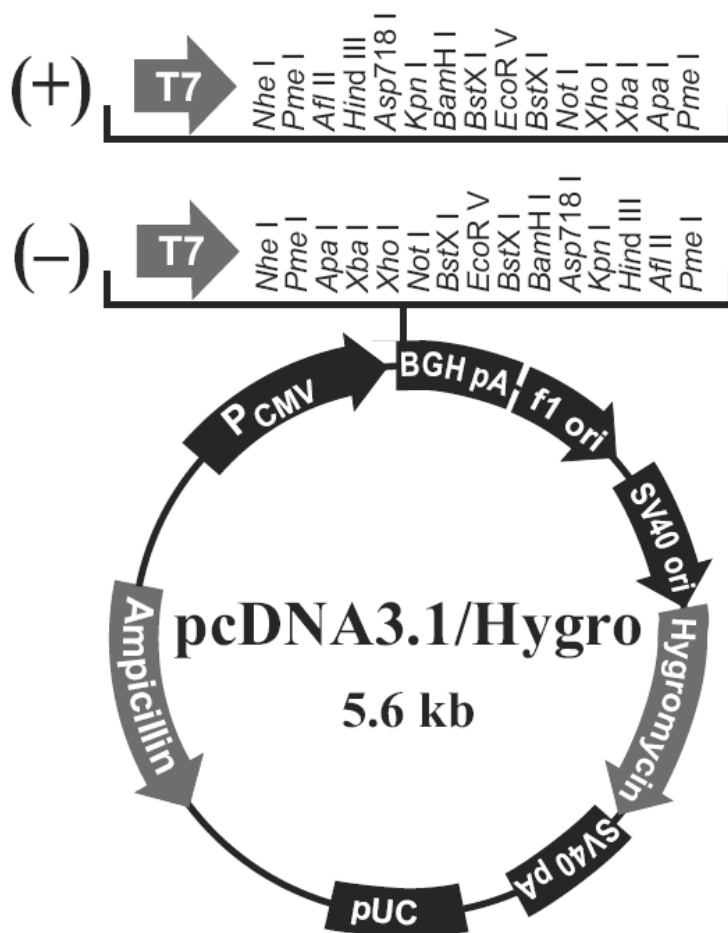
3.1.2.1 Příprava expresního vektoru pcDNA3.1

Expresní vektor pcDNA3.1 Hygro (Obr. VIII) byl vybrán pro své rozsáhlé klonovací místo, obsahuje cytomegalovirový promotor, pUC počátek replikace a pro selekci v *E. Coli* obsahuje gen pro rezistenci k ampicilinu a hygromycinu.

S pomocí příslušných restrikčních enzymů byla provedena dvojitá restrikce AS variant BRCA1 Δ 5 a BRCA1 Δ 10 (insertu) ve vektoru pCR2.1 a následná ligace insertu do expresního vektoru pcDNA3.1 Hygro obsahujícího celou kódující sekvenci genu *BRCA1* (pcDNA3.1-wtBRCA1). Tento vektor byl linearizován a ošetřen stejnými restrikčními enzymy jako insert. Konečným produktem ligace byly expresní vektory pcDNA3.1 Hygro

nesoucí sekvenci AS varianty BRCA1Δ5 (pcDNA3.1-BRCA1Δ5) nebo sekvenci alternativní sestřihové varianty BRCA1Δ10 (pcDNA3.1-BRCA1Δ10).

Restrikce a ligace probíhaly souběžně v jedné reakční směsi. Do ligační reakce byly přidány 2 μl 10x pufru Cut Smart (New England Biolabs), 1 μl restrikčního enzymu *Hind*III, 0,5 μl restrikčního enzymu *Kpn*I (BRCA1Δ5) nebo *Xho*I (BRCA1Δ10), 2 μl ATP a 1 μl T7 DNA ligázy (New England Biolabs). Podle koncentrace DNA ve vzorcích vektoru a insertu bylo do reakce přidáno takové množství, aby poměr vektor : insert odpovídal poměru 5 : 1. Dále se reakce doplnila do 20 μl dH₂O. Obsah PCR mikrozkušavky byl promíchán a stočen na stolní centrifuze. Mikrozkušavka byla vložena do PCR cykléru. Ligace probíhala 20 min při 37 °C, 20 min při 21 °C, 15 min při 37 °C, 25 min při 21 °C, 10 min při 37 °C a 30 min při 21 °C.



Obr VIII: Mapa vektoru *pcDNA3.1 Hygro*, pro ligaci AS varianty byly použity restrikční místa pro restrikční endonukleázy *Hind*III a *Xho*I.

3.1.2.2 Příprava expresního vektoru pmCherry-C1

Plasmid pmCherry-C1 (Obr. IX) byl vybrán proto, že obsahuje gen pro červený reportérový protein m-Cherry. Pro selekci v *E. Coli* obsahuje gen pro rezistenci ke kanamycinu.

Kódující sekvence obou AS variant byly v případě přípravy vektoru pmCherry-C1 vyštěpeny z vektoru pcDNA3.1 Hygro a zaligovány do vektoru pmCherry-C1. Ligace probíhala ve dvou restrikčních krocích. Důvodem byla nekompatibilita restrikčních míst v sekvenci vektoru pmCherry-C1 a insertu (AS varianty ve vektoru pcDNA3.1). Také jsme chtěli docílit co nejlepší fúze s referenčním genem, proto byla na 3' konci vektoru a 5' konci insertu zvolena ligace dvou tupých konců. Konečným produktem ligace byly expresní vektory pmCherry-C1 nesoucí kódující sekvenci AS varianty BRCA1 Δ 5 (pmCherry-BRCA1 Δ 5) nebo kódující sekvenci AS varianty BRCA1 Δ 10 (pmCherry-BRCA1 Δ 10).

V prvním restrikčním kroku byl insert (pcDNA3.1-BRCA1 Δ 5 nebo pcDNA3.1-BRCA1 Δ 10) opracován restrikční endonukleázou *HindIII*. Do reakce bylo přidáno 1,5 μ l 10x pufru Cut Smart, 2 μ l enzymu *HindIII*, 8 μ l insertu a celá reakce byla doplněna do 15 μ l dH₂O. Vektor byl v prvním kroku opracován restrikční endonukleázou *BspEI* (New England Biolabs). Do reakce bylo přidáno 1,5 μ l 10x pufru 3.1 (New England Biolabs), 1 μ l enzymu *BspEI*, 2 μ l vektoru a reakce byla opět doplněna dH₂O do 15 μ l. Mikrozkušavky s reakční směsí byly promíchány, stočeny na stolní centrifuze a inkubovány 45 minut při 37 °C.

Přesahující konce linearizovaného vektoru i insertu byly v oddělených reakcích otupeny. Do reakce bylo přidáno 9 μ l DNA (vektor nebo insert), 10 μ l 2x pufru pro „blunting“ enzym (B. E; Sigma Aldrich) a 1 μ l DNA B. E. Takto byly reakce inkubovány 5 minut při 70 °C.

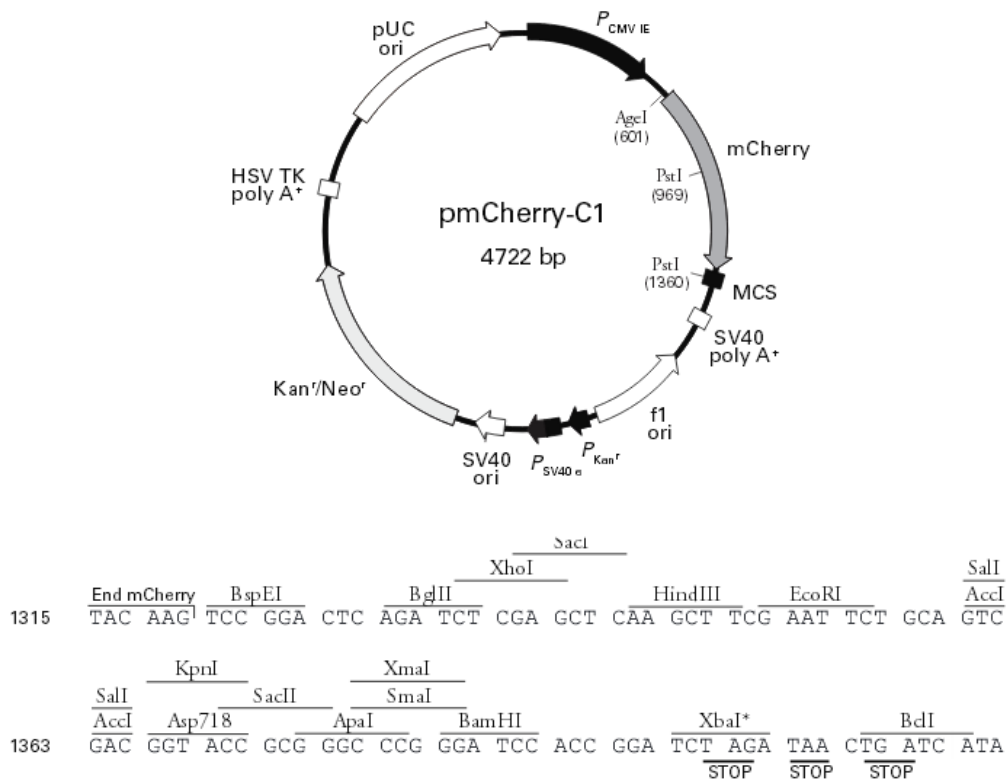
Následně byly obě reakce nanášeny do jamek 0,7% agaróзовého gelu a probíhala elektroforéza 40 minut při 90 V. Jako standard molekulové hmotnosti byl použit O'Gene ruller DNA ladder mix. Bandy odpovídající velikosti insertu a vektoru byly z gelu izolovány pomocí Zymoclean Gel DNA Recovery kitu.

V druhém restrikčním kroku byly insert i vektor opracovány restrikční endonukleázou *XhoI*. Reakce opět probíhaly odděleně. Do mikrozkušavky bylo napipetováno 1,5 μ l 10x pufru Cut Smart, 1 μ l restrikční endonukleázy *XhoI*, 9 μ l DNA (insert nebo vektor) a celá

reakce byla doplněna dH₂O do 15 µl. Mikrozkumavky byly promíchány, stočeny na stolní centrifuze a inkubovány 45 minut při 37 °C.

Obě reakce byly opět nanášeny na 0,7% agarózový gel. Elektroforéza probíhala 40 minut při 90 V a poté byly bandy odpovídajících velikostí izolovány pomocí Zymoclean Gel DNA Recovery kitu.

Následovala ligační reakce. Do mikrozkumavky byly napipetovány 2 µl ligačního pufru pro T4 DNA ligázu (New England Biolabs), 1 µl T4 DNA ligázy (New England Biolabs) a insert s vektorem. Bylo přidáno takové množství, aby reakce obsahovala 100 ng insertu a 50 ng vektoru. Reakce byla doplněna do 10 µl dH₂O a byla inkubována 2 hodiny při 20 °C.



Obr. IX: Mapa vektoru *pmCherry-C1*, pro vložení sestřihové varianty byly použity restriční endonukleázy *BspEI* a *XhoI*.

3.1.3 Transformace kompetentních buněk

Celý obsah ligační reakce byl přidán ke kompetentním buňkám TOP 10F⁻ (Thermo Fisher Scientific), které byly inkubovány 10 minut na ledu. Následujících 30 minut byla zkumavka s buňkami ponechána na ledu. Poté byl proveden tepelný šok, kdy byla zkumavka s buňkami na 30 sekund ponořena do vodní lázně o teplotě 42 °C a následně na 1 minutu vrácena na led. Po vyjmutí zkumavky z ledu bylo přidáno 250 µl S. O. C. („Super optimal broth with catabolite repression“; Sigma Aldrich) média o pokojové teplotě a buňky byly inkubovány při standardních podmínkách (37 °C a 5% CO₂) v termoboxu (Sanyo). Po hodině inkubace byly buňky s médiem vysety na Petriho misku s LB agarem (Sigma Aldrich). V případě transformace buněk vektorem pcDNA3.1 Hygro obsahoval LB agar ampicilin s antibiotikem (ampicilin nebo kanamycin; Sigma Aldrich). Následně byly buňky inkubovány při standardních podmínkách přes noc.

Následující den byly narostlé kolonie jednotlivě přeočkovány do jamek 96jamkové destičky. Každá jamka obsahovala 200 µl LB média s antibiotikem (ampicilin nebo kanamycin). Takto byly buňky opět inkubovány přes noc při standardních podmínkách.

3.1.4 PCR s buněčnou suspenzí

Pro kontrolu, zda buňky obsahují námi požadovanou sekvenci, byla provedena PCR s buněčnou suspenzí. Do PCR destičky bylo napipetováno 10 µl reakční směsi obsahující 1 µl 10x pufru RED Taq (Sigma Aldrich), 0,25 µl dNTPs, 0,25 µl primeru 1, 0,25 µl primeru 2, 1,25 µl buněčné suspenze (každá jamka PCR destičky odpovídala příslušné jamce 96jamkové destičky), 0,5 µg RED Taq polymerázy (Sigma Aldrich) a 6,5 µl dH₂O. Jako primery byly použity vždy dvojice vnějších primerů z PCR sestřihu (del5/10Af a del5Br, del5/10Af a del10Br). Pro PCR program bylo použito dvou cyklů. První cyklus, ve kterém byla použita touch-down PCR – 30 sec při 94 °C, 30 sec při 72 až 58 °C, 2 min při 72 °C – se opakoval 15krát. Druhý cyklus – 30 sec při 94 °C, 30 sec při 60 °C, 2 min při 72 °C – se opakoval 20krát. Iniciační denaturace probíhala 1 minutu při 95 °C a konečná elongace 8 minut při 72 °C.

Následně byla provedena elektroforéza v 0,7% agarózovém gelu, 40 minut při 90 V. Vzorky s odpovídající velikostí PCR produktů byly z 96jamkové destičky nasazeny do 5 ml LB média s antibiotikem (ampicilin nebo kanamycin). Vzorky byly inkubovány přes noc

při 37 °C na míchačce (N-Biotek) s rychlostí nastavenou na 220 otoček/minutu. Další den byla ze vzorků izolována DNA pomocí Jet Star Plasmid Purification kitu (Genomed).

3.1.5 Sekvence

Pro sekvenaci byly použity kombinace několika primerů (Tab. III). Pro každý z primerů byla připravena jedna reakce s každým vzorkem. V prvním kroku sekvenace probíhala PCR amplifikace. Do reakce byl přidán 1 µl reakčního pufru Big Die 3.1 (Applied Biosystems), 1 µl 5x sekvenačního pufru ABI (Applied Biosystems), 0,2 µl primeru, 0,4 µl DNA (o koncentraci asi 400 ng/µl) a reakce byla doplněna dH₂O do 5 µl. Sekvenační reakce probíhaly v 96jamkové sekvenační destičce. Po napipetování reakcí byla destička promíchána a stočena na stolní centrifuze. Primární denaturace probíhala 3 minuty při 96 °C. Cyklus – 10 sec při 96 °C, 5 sec při 50 °C, 4 min při 60 °C – se opakoval 25krát.

Tab. III: Primery použité pro sekvenování

Sekvence primerů	Místo nasedání	Sekvence AS varianty
5' – CAAGCTTGACCTGGATTTATCTGCTC – 3'	vektor	BRCA1Δ5, Δ10
5' – GATCAAGGAACCTGTCTCCAC – 3'	exon 3	BRCA1Δ5, Δ10
5' – CTCAAAGACGTCTGTCTAC – 3'	exon 7	BRCA1Δ5, Δ10
5' – CTCCCAACTTAAGCCATGT – 3'	exon 10	BRCA1Δ5
5' – AGATGATGGTGAAATAAAGG – 3'	exon 10	BRCA1 Δ 5
5' – AGTCAGCTCGTGTGGCAAC – 3'	exon 15	BRCA1Δ5, Δ10
5' – GACCTCGAGCAGTCAGTAGTGGCTG – 3'	vektor	BRCA1Δ5, Δ10

K sekvenační reakci bylo přidáno 1,3 µl 0,125 mol/ml čerstvě připravené ethylendiaminotetraoctové kyseliny (Sigma Aldrich), 1,3 µl 3 mol/ml octanu sodného (Sigma Aldrich) o hodnotě pH 5,2 a 30 µl 100% etanolu (Sigma Aldrich). Po přidání těchto reagentů byla sekvenační destička zvortexována, 5 minut ponechána při pokojové teplotě a poté centrifugována 30 minut při 3000 x g a 4 °C. Přebytek chemikálií byl z destičky odstraněn. Dále bylo do každé jamky přidáno 60 µl 70% etanolu (Sigma Aldrich) a následovala centrifugace po dobu 20 minut při 3000 x g a 4 °C. Přebytek etanolu byl opět odstraněn, vzorky v otevřené destičce byly sušeny 4 minuty při 95 °C a poté ponechány 20 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci při pokojové teplotě bylo přidáno 12 µl formamidu (Sigma

Aldrich), destička byla zavíčkována, zvortexována, stočena v centrifuze a ponechána minimálně 15 minut při pokojové teplotě. Těsně před sekvenací byly vzorky v destičce denaturovány 2 minuty při 95 °C a umístěny na led. Pro sekvenaci byl použit sekvenátor ABI3130 (Applied Biosystem).

3.2 Modelové systémy

Jako modelový systém pro analýzu aktivity HR a chybovosti NHEJ (DNA reparační analýzu) byla použita buněčná linie U-2 OS se stabilně zainkorporovanými konstrukty nesoucími segmenty pro expresi zeleného fluorescenčního proteinu GFP a červeného fluorescenčního proteinu dsRed. Tato linie byla poskytnuta Dr. Powelem (Bindra et al., 2013). Byla vybrána proto, že umožňuje stanovit kapacitu reparace dvouřetězcových zlomů pomocí HR a NHEJ. U-2 OS je adherentní buněčná linie odvozená od osteosarkomu.

Pro určení buněčné lokalizace AS variant fluorescenční mikroskopii byla vybrána buněčná linie MCF7. Linie MCF7 je adherentní buněčná linie odvozená od adenokarcinomu prsu.

3.3 Práce s buněčnými kulturami

Buňky byly kultivovány v lahvičce F25 s „Dulbecco-modified Eagles medium“ (DMEM, Invitrogen) obsahujícím 10 % fetálního telecího séra (FCS) s přidáním L-glutaminu, penicilinu a streptomycinu (Gibco). Buňky nasazené do tohoto média byly kultivovány při 37 °C a v 5% atmosféře CO₂ (standardních podmínkách). Při kultivaci bylo médium po třech dnech měněno za nové. Konfluentní buňky byly pasážovány v poměru 1:10. Médium z lahvičky bylo odsáto a buňky byly promyty fosfátovým pufrem (PBS, Invitrogen). Bylo přidáno 1,5 ml trypsinu (Invitrogen) pro uvolnění buněk ze stěny lahvičky. Trypsin byl po minutě odstraněn a buňky byly na 5 minut umístěny do inkubátoru. Do lahvičky bylo přidáno 5 ml DMEM, kterým byly buňky smyty z povrchu lahvičky. Suspenze buněk s DMEM byla přenesena do 15ml zkumavky obsahující 5 ml DMEM. Po promíchání bylo ze zkumavky odebráno 0,8 ml suspenze, která byla přenesena do lahvičky obsahující 8 ml DMEM s 10% FCS, L-glutaminem a antibiotiky.

3.3.1 Transfekce buněk linie U-2 OS

Pro stanovení aktivity HR a vlivu AS variant na chybovost NHEJ byly použity buňky buněčné linie U-2 OS. Tyto buňky obsahují konstrukty potřebné pro DNA reparační analýzu – konstrukty pro fluorescenční proteiny GFP a dsRed. Buňky byly transfekovány expresním vektorem pcDNA3.1 Hygro nesoucím AS varianty nebo wtBRCA1. Dvě hodiny před transfekcí bylo kultivační médium DMEM vyměněno za médium OPTI-MEM (Gibco) s přidavkem 2,5% FCS. Samotná transfekce probíhala s přidavkem Liptofectaminu 3000 (Life technologies), kdy byl použit 1 μ l Liptofectaminu 3000 na 1 μ g vektoru. Transfekční mix obsahoval 4 μ vektoru pcDNA3.1 Hygro nesoucího AS varianty nebo wtBRCA1 (kontrola) a 4 μ l Liptofectaminu 3000. V případě down-regulovaného BRCA1 byl použit vektor pSUPER, který nese interferující RNA. Sekvence interferující shRNA byla 5' – GATCCCCGTTTGAGGTGTCTGCAGATTTCAAGAGAATCTGCAGACACCTCAAAC TTTTGGAC – 3' a byla cílena do exonu 14. Funkčnost vektoru pSUPER byla potvrzena v předchozích experimentech (Sevcik et al., 2012, 2013). Interferující RNA nesena pSUPER snižuje expresi BRCA1 asi na 10 %. Transfekční mix pro down-regulaci BRCA1 byl opět přípravou smícháním 4 μ g vektoru pSUPER a 4 μ l Liptofectaminu 3000.

Po dvoudenní inkubaci při standardních podmínkách v médiu OPTI-MEM s transfekčním mixem byly buňky transfekovány expresním vektorem nesoucím gen pro enzym *SceI* (pSceI), který po expresi indukuje vznik DSB. Transfekční mix obsahoval 1 μ g pSceI a 1 μ l Liptofectaminu 3000.

Po dalších dvou dnech inkubace při standardních podmínkách v OPTI-MEM s transfekčním mixem byly buňky rostoucí na jedné misce rozděleny na dvě poloviny. U jedné z populací byl proveden western blotting pro ověření exprese AS variant a over-exprese a down-regulace exprese wtBRCA. U druhé poloviny buněk byla provedena DNA reparační analýza.

3.3.2 Transfekce buněk linie MCF7

Pro stanovení buněčné lokalizace AS variant byla použita fluorescenční mikroskopie. Jako modelový systém byly použity buňky linie MCF7 transfekované expresním vektorem pm-Cherry-C1 nesoucím AS varianty. Buněčná linie U-2 OS nemohla být použita z důvodu bazální exprese GFP a dsRed, která by dávala falešný signál.

Buňky byly transfekovány expresním vektorem pm-Cherry-C1 nesoucím AS varianty. Současně byly transfekovány vektorem pOPRSVI-YFP nesoucím wtBRCA1 (pOPRSVI-YFP- wtBRCA1), který byl poskytnut B. Hendersonem (Mok and Henderson, 2010). Transfekční mix obsahoval 1 μg pm-Cherry-BRCA1 Δ (5, 10), 1 μg pOPRSVI-YFP-wtBRCA1 a 2 μl Liptofectaminu 3000. Buňky byly inkubovány 1 den při standardních podmínkách s OPTI-MEM a transfekčním mixem.

3.4 Izolace proteinů a western blotting

Z buněk modelových systémů transfekovaných vektory nesoucími AS varianty a z kontrolních buněk byly vyizolovány proteiny pomocí kitu Complete lysis M (Roche). Koncentrace proteinů byly stanoveny pomocí metody BCA („Bicinchoninic acid“) za použití kitu Pierce BCA protein assay (Thermo Scientific). Absorbance byla měřena nanodropem (Thermo Scientific). Naměřené koncentrace byly použity pro stanovení množství vzorku pro následnou SDS-PAGE elektroforézu.

Metoda BCA je založena na redukci Cu^{2+} na Cu^+ peptidovými vazbami obsaženými v proteinech. Měďnaté ionty jsou obsaženy v pentahydrátu sulfidu měďnatého, který je součástí pracovního roztoku. Kyselina bycinchoninová poté tvoří reakcí s Cu^+ fialový produkt. Absorbance se měří při 562 nm. Množství redukovaných iontů odpovídá intenzitě zbarvení vzorku a je přímo úměrné množství proteinů ve vzorku. Výhodou BCA metody je, že není citlivá na detergenty obsažené v lyzačních pufrch (Smith et al., 1985).

3.4.1 SDS-PAGE elektroforéza

Proteiny byly rozděleny podle molekulové hmotnosti na polyakrylamidovém gelu pomocí horizontální SDS-PAGE elektroforézy. Pro SDS-PAGE elektroforézu byl připraven 8% separační (Tab. III) a 10% zaostřovací gel (Tab. IV). Mezi skla vložená do aparatury pro přípravu gelů byly navrstveny asi 4 ml separačního gelu, který byl převrstven deionizovanou vodou. Polymerizace gelu probíhala asi 30 minut. Poté byla voda odstraněna filtračním papírem. Na separační gel byl navrstven zaostřovací gel, do kterého byl vložen hřebínek. Polymerizace opět probíhala asi 30 minut. Poté byl odstraněn hřebínek a gel byl umístěn do elektroforetické vany s 1x Tris-glycinovým (TGS; Bio-Rad) elektroforetickým pufrům s SDS (dodecylsírán sodný).

Vzorky proteinů byly smíchány s 6x Laemliho vzorkovým pufrem (1,2 g SDS, 6 g bromfenolové modři, 4,7 ml glycerolu, 1,2 ml 0,5 M Tris pH 6,8, doplnit dH₂O do 10 ml, povařit a rozpustit) a byly denaturovány 5 minut při 98 °C. Do první jamky byl napipetován standard molekulové hmotnosti (Precision plus protein dual color standards, Bio-Rad) a do dalších jamek byly naneseny vzorky. Separace proteinů probíhala 40 minut při 150 V.

Tab. IV: Složení zaostřovacího a separačního gelu. (4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8: 6,05 g Tris a 0,4 g SDS rozpustit v dH₂O, upravit pH na 6,8 pomocí HCl, doplnit dH₂O do 1000 ml; 4x Tris-Cl/SDS, pH8,8: 91 g Tris a 2 g SDS rozpustit ve 300 ml dH₂O, upravit pH na 8,8 pomocí HCl, doplnit dH₂O do 500 ml

	8% separační gel	10% zaostřovací gel
30% akrylamid/8% bisakrylamid (Bio-Rad) [ml]	3,75	0,65
4x Tris-Cl/SDS, pH 6,8 [ml]	-	1,25
4x Tris-Cl/SDS, pH8,8 [ml]	3,75	-
dH ₂ O [ml]	7,5	3
10% APS [μl]	50	25
TEMED [μl]	8	5

3.4.2 Western blotting

PVDF membrána byla po dobu 5 sekund aktivována ve 100% methanolu (Sigma Aldrich), následně propláchnuta v deionizované vodě a přesunuta do Towbinova blotovacího pufru (100 ml 10x Towbinova blotovacího pufru, 200 ml MetOH, doplnit do 1000 dH₂O). Gel byl vyjmut ze skel a byl odstraněn zaostřovací gel. Gel byl propláchnut v Towbinově blotovacím pufru. Poté byl sestaven tzv. blotovací sandwich – houba, filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír, houba. Byla sestavena blotovací aparatura a přenos proteinů probíhal 1 hodinu při 350 mA.

Membrána s přenesenými proteiny byla propláchnuta v 1x pufru Tris s 0,1% Tween20 (TBSt; 100 ml 10x TBS, 900 ml dH₂O, 1 ml Tween20). Podle standardu molekulové hmotnosti byly na membráně vyznačeny úseky odpovídající velikosti proteinu BRCA1 (220 kDa, 170 kDa) nebo β-aktinu (42 kDa). B-aktin byl použit jako pozitivní kontrola. Následovala inkubace v blokovacím pufru (5 g odtučněného sušeného mléka, 95 ml 1x TBSt), která probíhala přes noc při 4 °C.

Pro imunodetekci BRCA1 a AS variant BRCA1 byla použita směs primárních myších („mouse“) monoklonálních protilátek (Ab1, Ab2; Calbiochem). Byla použita směs dvou

protilátek nasedajících na různé epitopy, a to vzhledem k velké deleci v BRCA1 Δ 10. Protilátky byly naředěny s blokovacím pufrům. Konečná koncentrace obou protilátek byla 2 μ g/ml. Pro imunodetekci β -aktinu byla použita primární myší protilátka (Sigma Aldrich). Byla také naředěna s blokovacím pufrům na koncentraci 2 μ g/ml. Membrána byla s takto připraveným roztokem inkubována po dobu 2 hodin při 4 °C. Následně byla membrána 1 hodinu při 4 °C oplachována v TBS_t pufru. Mezi tím byly naředěny sekundární „anti-mouse“ protilátky (Calbiochem, Sigma Aldrich) asociované s křenovou peroxidázou. Sekundární protilátky byly naředěny s blokovacím pufrům na koncentraci 2 μ g/ml. Membrána byla se sekundárními protilátkami inkubována přes noc při 4 °C.

Další den byla membrána 5krát po 5 minutách promyta v TBS_t pufru. Následně byla 5 minut inkubována s roztokem obsahujícím substrát pro křenovou peroxidázu (West-pico chemiluminescence kit; Pierce). V temné místnosti byl chemiluminiscenční signál vizualizován na film (Kodak).

3.5 DNA reparační analýza

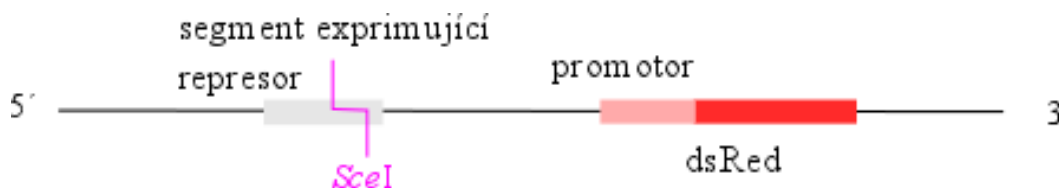
DNA reparační analýza probíhá na základě dvou referenčních genů, které jsou stabilně zainkorporovány do genomu buněk linie U-2 OS. Je to gen pro fluorescenční protein GFP a dsRed.

Pro stanovení aktivity HR slouží v buňkách jako reportérový protein GFP. Buňky obsahují dva homologní segmenty důležité pro expresi zeleného fluorescenčního proteinu GFP, které jsou odděleny krátkým linkerem. První segment pro GFP obsahuje aktivní promotor, ale po přepisu do mRNA vzniká předčasný STOP kodon, takže GFP nevzniká. Před sekvencí pro předčasný STOP kodon se vyskytuje restriční místo pro enzym *SceI* (Obr. X). Druhý gen pro GFP není exprimován, protože neobsahuje promotor. Pokud dojde k indukci DSB v restričním místě pro *SceI* a následné opravě pomocí HR pomocí druhého nepoškozeného segmentu, bude vznikat GFP. Množství buněk exprimujících funkční GFP protein odráží aktivitu HR.



Obr. X: Stanovení aktivity HR na základě exprese GFP. Buňky linie U-2 OS obsahují konstrukt nesoucí dva homologní segmenty důležité pro expresi GFP. Promotor obsahuje pouze první segment. Jeho přepisem ale vzniká mRNA s předčasným STOP kodonem. Vzniká tedy neaktivní GFP. Ve struktuře prvního segmentu je také restriční místo pro enzym *Scel*, ve kterém může dojít k indukci DSB. Pokud po poškození dojde k opravě HR podle druhého segmentu, bude vznikat aktivní GFP.

Pro stanovení chybovosti NHEJ slouží červený fluorescenční protein dsRed. Buňky obsahují konstrukt nesoucí gen pro dsRed a segment kódující represor, který inhibuje expresi dsRed. Sekvence pro represor je unikátní a obsahuje restriční místo pro enzym *Scel* (Obr. XI). Represor se za normálních okolností exprimuje a váže se na promotor genu dsRed. Červený dsRed není exprimován. Pokud dojde k indukci DSB pomocí enzymu *Scel*, dochází k opravě pomocí NHEJ. Může proběhnout buď bezchybně a represor je stále exprimován. Může také dojít k chybnému spojení konců DSB. V tomto případě se represor neexprimuje, nedochází k inhibici promotoru a dojde k expresi červeného reportérového proteinu dsRed.



Obr. XI: Stanovení chybovosti NHEJ na základě exprese dsRed. Buňky linie U-2 OS obsahují konstrukt nesoucí gen pro fluorescenční protein dsRed a také segment kódující represor, který inhibuje expresi dsRed. Segment kódující represor je v celém genomu buňky unikátní a obsahuje restriční místo pro enzym *Scel*. Pokud dojde k indukci DSB pomocí *Scel* a chybně opravě díky NHEJ, nebude vznikat represor a dojde k expresi červeného dsRed.

Transfekované buňky linie U-2 OS určené pro DNA reparační analýzu byly promyty a resuspendovány v PBS a zředěny na množství 300 000 buněk/ml. Buňky exprimující GFP (pro HR), dsRed (pro NHEJ) nebo oba proteiny byly rozděleny pomocí průtokové cytometrie (na FACS – „fluorescence activated cell sorting“). Sortování buněk proběhlo na průtokovém cytometru AMNIS ImageStream X mkII s lasery Amnis – EMD Millipore (Seattle WA, USA) s excitačním spektrem 375, 405, 488, 561 a 642 nm a systémovým softwarem INSPIRE (780-01286- 01 Rev: B, Amnis – EMD Millipore).

3.6 Fluorescenční mikroskopie

Buňky linie MCF7 transfekované pm-Cherry-BRCA1($\Delta 5$ nebo $\Delta 10$) a zároveň pOPRSVI-YFP- wtBRCA1 (získaným od Dr. Hendersona – Mok and Henderson, 2010), byly zafixovány na sklíčko. Fixace buněk probíhala při pokojové teplotě 10 minut se 4% paraformaldehydem (Sigma Aldrich) a poté 14 minut s 0.2% Triton X100 (Sigma Aldrich) v PBS. Jádro (chromatin v jádře) byl obarven TOPRO-3 1 $\mu\text{mol/l}$ (Molecular probes). Fluorescenční obraz byl získán mikroskopem OlympusBX41 s objektivem pro použití s imerzním olejem Plan Fluotar (40 \times /NA1.3).

4 Cíle práce

- 1. Příprava modelového systému pro funkční *in vitro* analýzu alternativních sestřihových variant genu *BRCA1***
 - Příprava expresních konstruktů s insertem *BRCA1* Δ 5 a Δ 10
 - Ověření funkčnosti modelového systému
- 2. Funkční analýza alternativních sestřihových variant *BRCA1* Δ 5 a Δ 10**
 - Stanovení vlivu modifikace exprese genu *BRCA1* na aktivitu hlavních drah opravy dvouřetězcových zlomů DNA (homologní rekombinace a NHEJ)
 - Stanovení intracelulární lokalizace alternativních sestřihových variant *BRCA1* Δ 5 a Δ 10 v buňkách modelového systému

5 Výsledky

5.1 Příprava expresních vektorů s inserty alternativních sestřihových variant BRCA1 Δ 5 a Δ 10

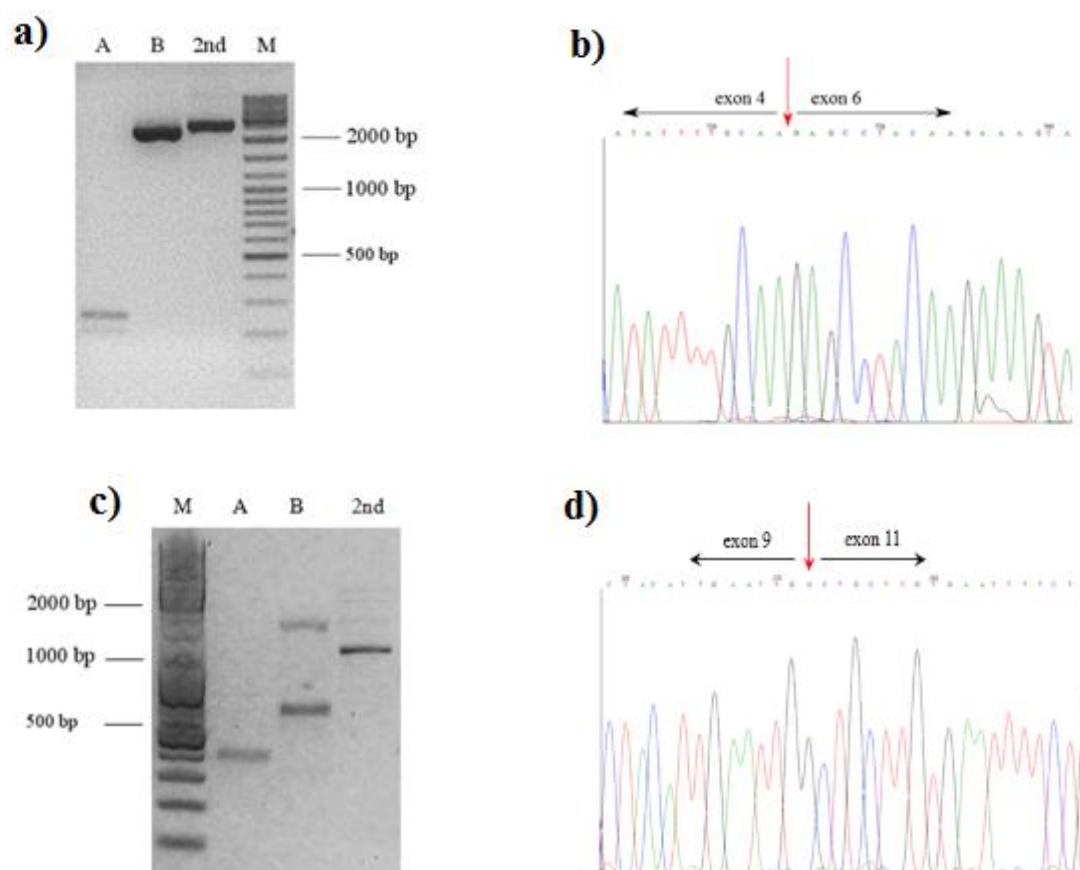
Na základě předchozích výsledků výzkumu prováděných na pracovišti (Laboratoř onkogenetiky Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. Lékařské Fakulty Univerzity Karlovy v Praze) byly pro detailní funkční analýzu přednostně vybrány kvantitativně majoritní alternativní sestřihové varianty genu *BRCA1* – *BRCA1 Δ 5* a *Δ 10*. Expres těchto variant byla na úrovni mRNA prokázána v řadě stabilních buněčných linií a ve zvýšené míře i u řady jedinců s hereditární formou karcinomu prsu a/nebo ovária. Pro experimentální účely bylo nejprve nutné připravit expresní konstrukty s těmito AS variantami. Vzhledem k nízké kvalitě genetického materiálu získaného přímo od jedinců se zvýšenou expresí *BRCA1 Δ 5* a *Δ 10* nebylo možné provést PCR amplifikaci a následnou ligaci celé rozsáhlé kódující sekvence *BRCA1 Δ 5* a *Δ 10* do expresního vektoru. Proto byly expresní konstrukty připraveny metodou sestřihové PCR.

Jako templát pro tuto dvoustupňovou amplifikaci byl použit plasmid pcDNA3.1 Hygro s insertem kompletní kódující oblasti genu *BRCA1*. Tento plasmid byl získán od prof. Harkina (Quinn et al., 2003). V prvním kroku PCR sestřihu byly amplifikovány kódující sekvence před a za deletovanými exony (PCR A a PCR B) a ve druhém kroku byly tyto dvě sekvence na základě homologních sekvencí použitých primerů spojeny (2nd PCR) (Obr. XIIa, c).

Připravené inserty sestřihových variant byly nejprve přímo vloženy do klonovacího vektoru pCR2.1. Po amplifikaci byly z tohoto vektoru vyštěpeny a zaligovány do expresních vektorů pcDNA3.1 Hygro a pm-Cherry-C1. Vložení insertu do klonovacího místa expresního vektoru proběhlo na základě opracování vektoru i insertu stejnými restrikcími enzymy (*HindIII* a *XhoI*) a ligace pomocí T4 DNA ligázy. V případě varianty *BRCA1 Δ 5* byla vyměněna pouze část sekvence wt*BRCA1* za část sekvence *BRCA1 Δ 5*. V případě *BRCA1 Δ 10* byla ve vektoru vyměněna celá sekvence wt*BRCA1* za *BRCA1 Δ 10*. Hotové konstrukty byly amplifikovány transformací do kompetentních buněk TOP 10F⁻ a následně osekvenovány v plné délce insertu (Obr. XIIb, d).

Vektory pcDNA3.1 Hygro nesoucí sekvence *BRCA1 Δ 5* a *BRCA1 Δ 10* byly použity jako zdroj insertu pro ligaci do vektoru pm-Cherry-C1. V tomto expresním vektoru byl insert příslušné AS varianty *BRCA1* na svém N-konci fúzován s červeným fluorescenčním

proteinem m-Cherry pro účely fluorescenční mikroskopie. Vložení insertu opět probíhalo na základě opracování vektoru i insertu restrikcčními enzymy (*BspEI* a *HindIII*) a ligace pomocí T4 DNA ligázy. Kosonstrukty byly vloženy do buněk TOP 10F⁻, byl proveden PCR screening a pozitivní klony byly osekvenovány v plné délce insertu (Obr. XIIb, c).



Obr. XII: PCR sestřih. Kódující sekvence alternativních sestřihových variant *BRCA1Δ5* (části **a**, **b**) a *Δ10* (části **c**, **d**) byly připraveny dvoustupňovou amplifikací pomocí optimalizované metody sestřihové PCR. V tomto procesu jsou nejprve amplifikovány oblasti vlevo a vpravo od deletovaného exonu (PCR A a B), které jsou následně ve druhém kroku (2nd) spojeny pomocí homologních konců. Srovnání rozdílů velikostí PCR produktů reakce A, B a 2nd PCR bylo provedeno pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Velikost produktu 2nd PCR přibližně odpovídala součtu velikostí produktů PCR A a B. M odpovídá standardu molekulové hmotnosti. Správnost celého postupu byla ověřena sekvenováním.

Pomocí optimalizovaného postupu PCR sestřihu byly připraveny expresní vektory pcDNA3.1 Hygro a pm-Cherry-C1 nesoucí kódující sekvenci alternativních sestřihových variant *BRCA1Δ5* a *Δ10*. Konstrukty pcDNA3.1-*BRCA1Δ5* a pcDNA3.1-*BRCA1Δ10* byly dále použity pro DNA reparační analýzu v buňkách linie U-2 OS a konstrukty

pm-Cherry-BRCA1 Δ 5 a pm-Cherry-BRCA1 Δ 10 byly použity pro zjištění buněčné lokalizace AS variant v buňkách linie MCF7.

5.2 Ověření funkčnosti modelového systému

Funkční analýza alternativních sestřihových variant BRCA1 Δ 5 a Δ 10 je založena na umělém zvýšení jejich exprese v buňkách modelového systému. Před samotným provedením funkčních *in vitro* testů, bylo nejprve nutné ověřit modifikaci exprese a přítomnost studovaných variant v transfekovaných buňkách U-2 OS a MCF7. Pro kontrolu exprese na úrovni proteinů byl použit western blotting. Kontrola exprese byla provedena simultánně s funkční analýzou ve stejných klonách buněk, jaké byly použity pro DNA reparační analýzu. Pro tyto účely byly transfekované buňky z jedné kultivační nádoby rozděleny na dvě identické populace. Jedna populace byla použita pro izolaci celkového proteinu a následné stanovení přítomnosti vyšetřované AS varianty (BRCA1 Δ 5 nebo Δ 10) pomocí western blottingu a druhá populace byla použita pro DNA reparační analýzu.

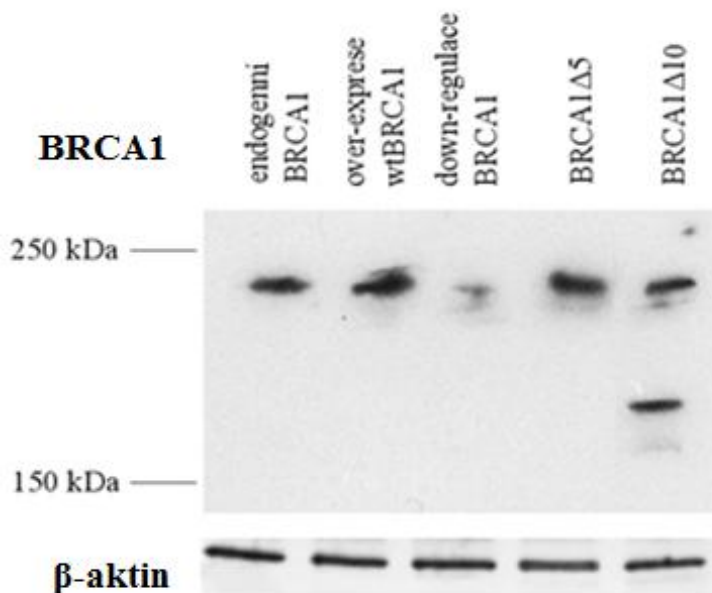
Pro DNA reparační analýzu byly jako modelový systém zvoleny buňky linie U-2 OS. Buňky byly transfekovány pcDNA3.1-BRCA1 Δ 5 a pcDNA3.1-BRCA1 Δ 10. Jako pozitivní kontrola byly také vytvořeny buňky over-exprimující wtBRCA1. Jako kontrola vlivu transfekčního postupu samotného, byly použity netransfekované buňky s normální expresí endogenního BRCA1. Jako negativní kontrola byly vytvořeny buňky s down-regulovanou (shRNA) expresí endogenního BRCA1. Z takto připravených buněk byly izolovány proteiny. Ty byly následně rozděleny na polyakrylamidovém gelu podle velikosti, přeneseny na PVDF membránu a detekovány pomocí primárních a sekundárních značených protilátek.

Pomocí western blottingu se v buňkách U-2 OS podařilo potvrdit specificky zvýšenou expresi alternativních sestřihových variant BRCA1 Δ 5 a Δ 10 (Obr. XIII), dále zvýšení exprese wtBRCA1 a snížení exprese endogenní BRCA1 pomocí interferenčních shRNA (Obr. XIII).

Vzhledem k tomu, že western blotting nedovoluje přesnou kvantifikaci jednotlivých proteinových izoforem, byla pouze na základě subjektivního hodnocení odhadnuta míra modifikace exprese BRCA1 u jednotlivých klonů. Bylo odhadnuto, že exprese BRCA1 proteinu byla u buněk transfekovaných vektory pcDNA3.1 Hygro (BRCA1 Δ 5, Δ 10 a wtBRCA1) zvýšena přibližně na dvojnásobek v porovnání s kontrolními netransfekovanými buňkami. Vzhledem k malému rozdílu ve velikosti BRCA1 Δ 5 a wtBRCA1 se nepodařilo od sebe tyto dva proteiny jednoznačně odlišit (velikost wtBRCA1 je 220kDa; odhadnutá

velikost izoformy BRCA1 Δ 5 je 210kDa). Naopak varianta BRCA1 Δ 10, která obsahuje jen asi 40% celé kódující sekvence BRCA1, byla od wtBRCA1 odlišitelná velmi dobře (velikost BRCA1 je 220 kDa; odhadnutá velikost izoformy BRCA1 Δ 10 je 170 kDa). Na základě výsledků western blottingu a následné imunodetekce se podařilo potvrdit specificky přítomnost vyšetřovaných izoform BRCA1 Δ 5 a Δ 10 v buňkách modelového systému na úrovni proteinu v době stanovení aktivity DNA reparačních drah (Obr. XIII).

Dále bylo potvrzeno snížení exprese endogenní BRCA1 pomocí interferenčních shRNA. Míra snížení exprese byla na základě subjektivního hodnocení odhadnuta na 25 % v porovnání s netransferovanými kontrolními buňkami. Bylo tedy potvrzeno specifické snížení exprese endogenní BRCA1 v buňkách modelového systému v době stanovení aktivity DNA reparačních drah.



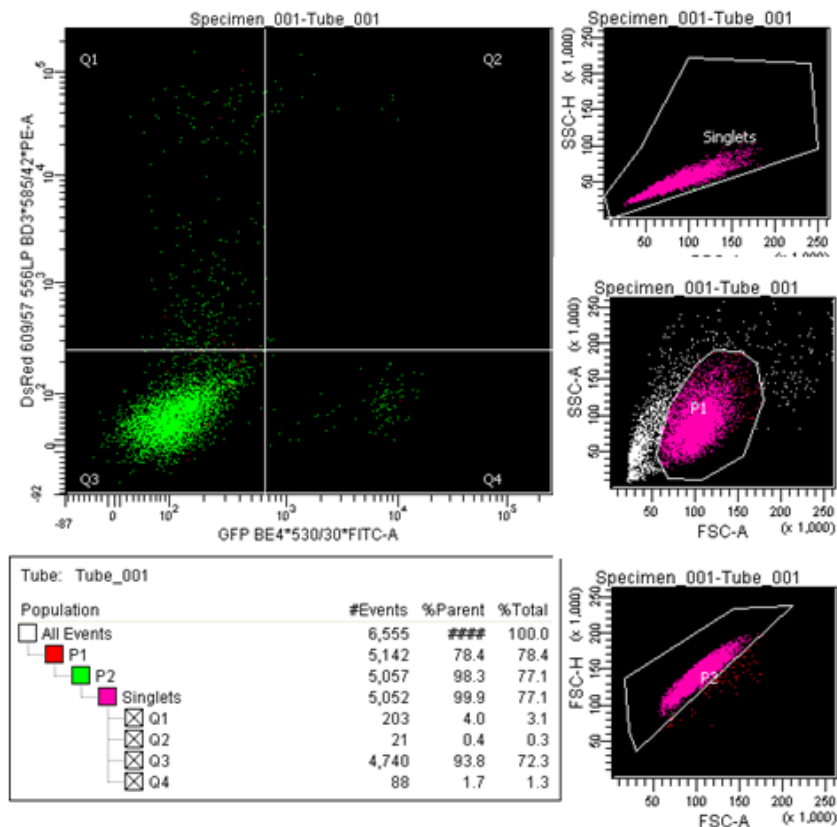
Obr. XIII: Kontrola exprese Δ S variant v buňkách modelového systému. Pomocí western blottingu bylo zjištěno, že buňky linie U-2 OS transfekované expresními vektory nesoucími Δ S varianty (BRCA1 Δ 5 a Δ 10), tyto varianty opravdu exprimují na úrovni proteinu. Jako kontrola byly použity netransfekované buňky exprimující endogenní BRCA1. Vzhledem k podobné velikosti proteinových izoform wtBRCA1 a BRCA1 Δ 5 se tyto nepodařilo pomocí elektroforézy a následné imunodetekce odlišit. Podle intenzity bandu, který odpovídá vzorku BRCA1 Δ 5 se ale dá soudit, že k expresi varianty docházelo. Vzhledem k většímu rozdílu ve velikosti proteinu BRCA1 Δ 10 (170 kDa) a wtBRCA1 (220 kDa), se exprese této varianty dala jednoznačně potvrdit. Dále bylo potvrzeno specifické snížení exprese endogenní BRCA1 na úrovni proteinu pomocí interferenčních shRNA. Kontrola provedení imunodetekce byla provedena simultánním stanovením β -aktinu spolu s BRCA1 proteinem.

Pomocí transientní transfekce buněk modelového systému vektorem peGFP-Max (Clontech) s insertem zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) a následnou analýzou průtokovou cytometrií, bylo dále zjištěno, že účinnost transfekce dosahuje reprodukcibilně hodnoty 65 %. Dá se tedy předpokládat, že nadpoloviční většina buněk při stanovení aktivity opravy DSB bude exprimovat příslušnou analyzovanou BRCA1 AS variantu.

5.3 Stanovení vlivu modifikace exprese genu *BRCA1* na aktivitu hlavních drah opravy dvouřetězcových zlomů DNA

Hlavní funkcí proteinu BRCA1 je přímý podíl na opravě dvouřetězcových zlomů DNA. Na tomto procesu se BRCA1 podílí jako mediátor homologní rekombinace. Výsledky řady prací současně naznačují podíl BRCA1 i na NHEJ (Dohrn et al., 2012; Jiang et al., 2013).. Vzhledem k těmto skutečnostem, jsme se primárně zaměřili na stanovení vlivu zvýšení exprese alternativních sestříhových variant BRCA1 Δ 5 a Δ 10 na aktivitu HR a NHEJ. Vzhledem ke kooperativnímu podílu HR a NHEJ na opravě dvouřetězcových zlomů DNA byl použit systém, který dovoluje stanovit aktivitu těchto dvou opravných procesů zároveň v podmínkách *in vitro*.

Modelovým systémem pro DNA reparační analýzu byly buňky linie U-2 OS transientně transfekované expresními vektory pcDNA3.1-BRCA1 Δ 5 a pcDNA3.1-BRCA1 Δ 10. Jako kontrolní buňky, ke kterým byly výsledky DNA reparační analýzy vztaženy, byly použity jednak buňky U-2 OS se zvýšenou expresí wtBRCA1, dále buňky U-2 OS se sníženou expresí endogenní BRCA1 a netransfekované U-2 OS buňky. Modifikované buňky linie U-2 OS jsou schopny exprese dvou referenčních proteinů, na jejichž základě je možné určit současně aktivitu HR a chybového NHEJ. Aktivitu HR reflektuje v tomto modelovém systému absolutní množství buněk exprimujících zelený fluorescenční protein (GFP). Míra chybovosti NHEJ je reflektována absolutním množstvím buněk exprimujících červený fluorescenční protein (dsRed). Stanovení bylo provedeno pomocí průtokové cytometrie (Obr. XIV).

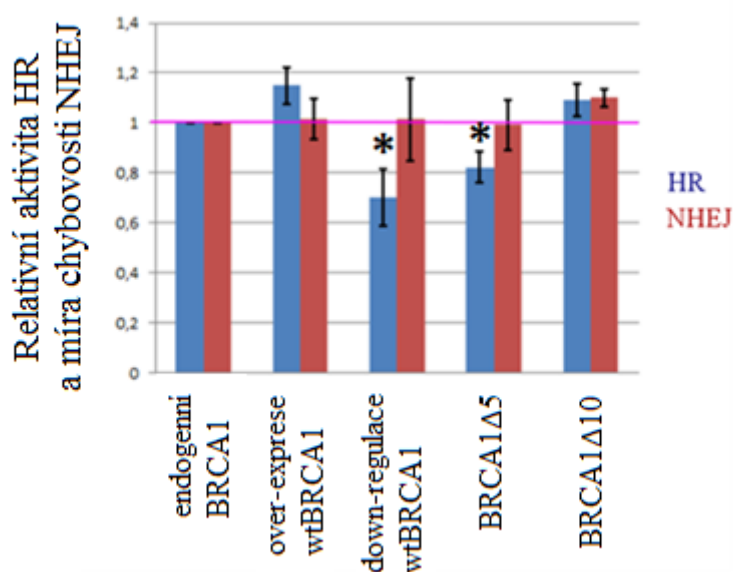


Obr. XIV: DNA reparační *in vitro* analýza. Buňky U-2 OS modelového systému, které mají ve svém genomu stabilně inkorporované kazety GFP a dsRed dovolující kvantitativně stanovit aktivitu homologní rekombinace a míru chybovosti NHEJ, byly nejprve transienně transfekovány expresními konstrukty pcDNA3.1-BRCA1($\Delta 5$, $\Delta 10$ nebo wt) a pSUPER. Po specifické modifikaci exprese BRCA1 (zvýšení exprese BRCA1 $\Delta 5$, $\Delta 10$ a wtBRCA1 a snížení exprese endogenní BRCA1) byly buňky transfekované podruhé vektorem pSceI, pomocí něhož byly specificky indukovány dvouřetězcové zlomy DNA v místech GFP a dsRed. Pomocí průtokové cytometrie byla selektována populace buněk vhodných pro analýzu na základě své velikosti a granularity (populace P1 a P2). Z takto připravené populace buněk byly pro analýzu vybrány pouze singlem, ve kterých se nakonec stanovily absolutní počty buněk exprimujících dané fluorescenční proteiny (GFP – Q4; dsRed-Q1 a obojí Q2).

Při vyhodnocování výsledků byly aktivita HR a míra chybovosti NHEJ vztaheny k hodnotám zjištěným u kontrolních netransferovaných buněk U-2 OS modelového systému (Obr. XV). Aktivita a míra chybovosti v těchto buňkách byly označeny jako 1 (100 %). Bylo zjištěno, že zvýšení exprese wtBRCA1 způsobuje mírné zvýšení aktivity HR, bez jakéhokoliv ovlivnění chybovosti NHEJ. Dále bylo zjištěno, že snížení exprese endogenní BRCA1 na 25 % hodnoty zjištěné u kontrolních buněk, statisticky významně snižuje aktivitu HR (na 70 % aktivity v kontrolních buňkách). Ani v tomto případě však nebyl zaznamenán významný vliv na míru chybovosti NHEJ (Obr. XV). Tyto výsledky, které jsou v souladu

s výsledky celé řady prací (Kass et al., 2013), potvrzují funkčnost a správnost použitého modelového systému.

Zvýšená exprese BRCA1 AS variant vykazovala v porovnání s netransfekovanými buňkami odlišné výsledky. Zvýšení exprese BRCA1 Δ 5 v našem experimentálním systému vedlo ke statisticky významnému snížení aktivity HR (na 80% aktivity v kontrolních buňkách). Změna v chybovosti NHEJ ale nebyla zaznamenána. Oproti tomu, zvýšení exprese BRCA1 Δ 10 vykazovala mírné, statisticky zanedbatelné, zvýšení aktivity HR i NHEJ (Obr. XV).



Obr. XV: Relativní aktivita homologní rekombinace (HR) a míra chybovosti NHEJ. Absolutní hodnoty aktivity HR a chybovosti NHEJ byly vztažena na aktivitu v kontrolních netransferovaných buňkách U-2 OS modelového systému. Aktivita v těchto buňkách byla stanovena jako 1 (100%). Zvýšení exprese wtBRCA1 (**over-exprese wtBRCA1**) vedlo k mírnému zvýšení aktivity HR, zatímco snížení exprese endogenní BRCA1 (**down-regulace wtBRCA1**) způsobilo statisticky významné snížení aktivity HR. AS varianta BRCA1 Δ 5 měla statisticky významný vliv na snížení aktivity HR. Aktivita HR v buňkách exprimujících BRCA1 Δ 5 byla v porovnání s netransfekovanými buňkami snižena asi o 20 %. AS varianta BRCA1 Δ 10 vykazovala nepatrné zvýšení aktivity HR a chybovosti NHEJ. Žádná modifikace exprese BRCA1 neměla vliv na míru chybovosti NHEJ. Prezentovaná data představují medián ze čtyř nezávislých technických opakování, *($p < 0,005$).

Z výsledků *in vitro* DNA reparační analýzy vyplývá, že snížení exprese endogenní BRCA1 má jednoznačně negativní dopad na aktivitu HR. Vyšetřované BRCA1 AS varianty mají na aktivitu HR zcela odlišný vliv. Proteinová izoforma BRCA1 Δ 5, které chybí N-terminální protein interakční RING doména, má na aktivitu HR negativní vliv. Zdá se tedy,

že RING doména proteinu BRCA1 je pro jeho funkci v HR nepostradatelná. Navíc, zvýšení exprese BRCA1 Δ 5 na pozadí normální exprese endogenní BRCA1 má na aktivitu HR dominantně negativní účinek. Tato proteinová izoforma tedy není schopná nahradit wtBRCA1 v procesu opravy dvouřetězcových zlomů DNA a její přítomnost ve zvýšené míře blokuje normální funkci wtBRCA1 v procesu HR. Oproti tomu přeskočení exonu 10, který kóduje asi 60 % proteinu, nemá paradoxně na aktivitu HR významný vliv. Výsledky naznačují, že tato proteinová izoforma je schopna plně nahradit wtBRCA1 izoformu v procesu opravy dvouřetězcových zlomů DNA a zvýšení její exprese nemá negativní vliv na udržení genomové integrity.

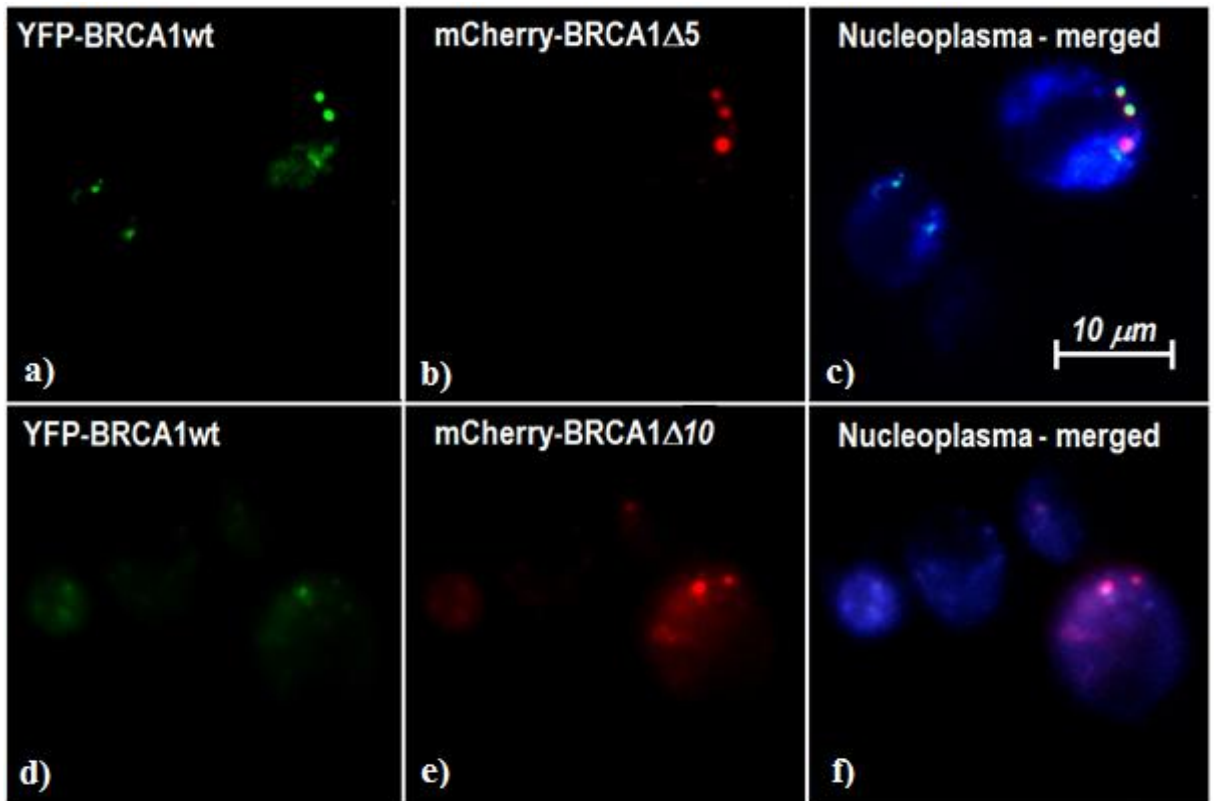
5.4 Buněčná lokalizace alternativních sestřihových variant BRCA1 Δ 5 a Δ 10 v buňkách modelového systému

Vzhledem k nezastupitelné roli BRCA1 v opravě DSB, je jeho buněčná lokalizace přednostně v jádře (Ruffner and Verma, 1997; Okada and Ouchi, 2003). Jelikož jsme detekovali snížení aktivity HR vlivem BRCA1 Δ 5, zajímali jsme se, jestli tato změna nesouvisí s buněčnou lokalizací. Buněčná lokalizace byla zjišťována pomocí flouorescenční mikroskopie u obou vyšetřovaných AS variant zároveň s wtBRCA1. Pro tyto účely byly kódující sekvence jednotlivých BRCA1 variant spojeny se sekvencí flouorescenčních proteinů (m-Cherry v případě BRCA1 AS variant a žlutý flouorescenční protein YFP v případě wtBRCA1). Vzhledem k relativně vysokému flouorescenčnímu pozadí u buněk U-2 OS použitých pro stanovení aktivity reparace DSB, byly pro účely flouorescenční mikroskopie zvoleny buňky MCF7 transientně ko-transfekované expresními vektory pmCherry-BRCA1 Δ 5 nebo pmCherry-BRCA1 Δ 10, kde je BRCA1 na svém N-konci fúzován s červeným flouorescenčním proteinem m-Cherry, a pOPRSVI-YFP-wtBRCA1, kde je BRCA1 na svém N-konci fúzován se žlutým flouorescenčním proteinem YFP.

WtBRCA1 byl podle očekávání lokalizován přednostně v jádře (Obr. XVIa, d). Stejná lokalizace byla zjištěna u obou AS variant (Obr. XVIb, e). Přičemž jaderná lokalizace vykazovala známky specifické lokalizace a nikoliv disperzní lokalizace v celé organelle (Obr. XVI c, f). Pokud se dá soudit z použité 2D flouorescenční mikroskopie, byly obě vyšetřované varianty – wtBRCA1 a příslušná AS BRCA1 lokalizovány zároveň v jednom místě (Obr. XVIc, f).

Pozorované snížení aktivity HR vlivem BRCA1 Δ 5 tedy v našem experimentálním systému nesouvisí s buněčnou lokalizací proteinu. Jaderná lokalizace zůstává zachována

i v případě BRCA1 Δ 10 (Obr. XVIe), kdy chybí nadpoloviční část proteinu. Delece nepostihují sekvence zodpovědné za buněčnou lokalizaci (NLS nebo NES) a zřejmě nemají vliv ani na interakci BRCA1 s BARD1. Díky vazbě s BARD1 totiž dochází k maskování NES a přetrvávání proteinu v jádře (Henderson, 2005).



Obr. XVI: Intracelulární lokalizace AS variant BRCA1 Δ 5 a BRCA1 Δ 10. Pomocí fluorescenční mikroskopie byla v buňkách MCF7 zároveň stanovena lokalizace wtBRCA1 a příslušné AS varianty (c, f). Pro tento účel byly buňky ko-transfekovány expresními vektory pm-Cherry-C1, ve kterých byla AS varianta na svém N-terminálním konci „in-frame“ fúzována s červeným fluorescenčním proteinem mCherry (mCherry-BRCA1 Δ , Δ 10) (b, e) a vektorem pOPRSVI, ve kterém byl wtBRCA1 na svém N-terminálním konci „in-frame“ fúzován se žlutým fluorescenčním proteinem (YFP-BRCA1wt) (a,d). Nukleoplasma byla barvena TOPRO (c, f). Multikanálový obraz 2D fluorescenční mikroskopie byl vytvořen složením snímků programem NIS elements ar.2.1.

6 Diskuze:

Vliv tumor supresorového genu *BRCA1* na vznik karcinomu prsu a ovarií je znám již řadu let. V rodinách postižených hereditárním karcinomem jsou v genomech zárodečných buněk velmi často identifikovány patogenní mutace v genu *BRCA1* (Easton et al., 1993; Futreal et al., 1994). Přítomnost takovéto inaktivující mutace typu delecí, přestaveb genomu nebo epigenetických mutací, významně zvyšuje celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu a dalších typů malignit, zejména karcinomu ovarií, pankreatu, nebo plic (Thompson et al., 2002). Vzhledem ke značnému vlivu genetických faktorů na vznik a rozvoj karcinomu prsu je věnována velká pozornost jejich identifikaci a popisu. Tyto znalosti jsou nezbytným předpokladem včasné diagnostiky malignity u postižených jedinců a v mnoha ohledech i rozhodujícím faktorem pro výběr vhodné protinádorové terapie. Přesto dosud popsané mechanismy inaktivace tumor supresorového genu *BRCA1* dovolují vysvětlit pouze část případů hereditárního karcinomu prsu. Tato skutečnost naznačuje možnost existence dosud neznámých mechanismů. Alternativní pre-mRNA sestřih je proces, který je schopen vytvářet proteinové izoformy s výrazně změněnou biologickou aktivitou. Jeho deregulace by potenciálně mohla mít negativní vliv na buněčnou homeostázu a přispívat k procesu maligní transformace. Vzhledem k relativně časté detekci AS variant genu *BRCA1* u pacientů z vysoce rizikových rodin, existuje předpoklad, že aberantní sestřih by mohl být jedním z mechanismů, které vedou k inaktivaci *BRCA1* a zvyšují riziko vzniku karcinomu prsu (Colombo et al., 2014; Romero et al., 2015).

Během screeningu vysoce rizikových pacientů byly v Laboratoři onkogenetiky Ústavu biochemie a experimentální onkologie 1. Lékařské Fakulty Univerzity Karlovy v Praze opakovaně detekovány některé AS varianty genu *BRCA1*. Mezi hlavní funkce proteinu *BRCA1* patří jeho přímá účast na procesu opravy poškozené DNA a to zejména při HR (O'Donovan and Livingston, 2010). Pokud je HR poškozena nebo porušena, dochází ke spojování DSB alternativní cestou, alt-NHEJ (Yu and Gabriel, 2003). Výsledkem je nahromadění mutací, které vedou k destabilizaci genomu a potenciálně i k maligní transformaci. Zdá se tedy, že AS varianty s vyšším zastoupením u rizikových pacientů by mohly mít vliv na aktivitu HR. Některé práce spojují *BRCA1* i s NHEJ, který může být bezchybný, ale také chybový (Dohrn et al., 2012; Jiang et al., 2013). Otázkou je, zda by AS varianty mohly mít vliv i na chybovost NHEJ.

V této práci se zabýváme vlivem kvantitativně významných AS variant s „in-frame“ delecí exonu 5 (BRCA1Δ5) a exonu 10 (BRCA1Δ10) na aktivitu HR a NHEJ. V našich modelových buňkách linie U-2 OS byl zjištěn vliv AS varianty BRCA1Δ5 na aktivitu HR (Obr. XV). Aktivita HR byla snížena asi o 20 % vzhledem k netransfekovaným kontrolním buňkám, které exprimovaly pouze endogenní wtBRCA1. Exon 5 genu *BRCA1* kóduje část N-terminální protein interakční RING domény (Brzovic et al., 2001; Clark et al., 2012). Ta je kromě vazby hlavního vazebného partnera BARD1 zodpovědná i za E3 ubikvitin ligázovou aktivitu proteinu BRCA1, která je důležitá pro jeho funkci jako tumorového supresoru (Lorick et al., 1999). Nezbytnost funkce RING domény pro HR byla dokázána experimentálně na mutantních formách genu *BRCA1*, ve kterých byla zaměněna sekvence kódující klíčové zbytky histidinu, vytvářejících v RING doméně strukturu zinkového prstu (Brzovic et al., 1998, 2003; Atipairin et al., 2010). Přesná příčina negativního vlivu na HR – ať už ztrátou schopnosti vázat BARD1, nebo ztrátou E3 ubikvitin ligázové aktivity, však není známa. Z našich výsledků dále vyplývá, že BRCA1Δ5 nejen že není schopna nahradit wtBRCA1 v procesu HR, ale působí na wtBRCA1 dominantně negativním efektem. Vzhledem k funkci BRCA1 jako protein interakčního modulátoru při řízení opravy dvouřetězcových zlomů (Greenberg et al., 2006), je možným vysvětlením tohoto jevu fakt, že BRCA1Δ5 se váže do místa DSB, kde není schopen plně aktivovat HR a zároveň brání vazbě plně funkční wtBRCA1 varianty. V tomto procesu tedy BRCA1Δ5 působí jako přímý inhibitor wtBRCA1. Porucha AS, která by vedla k nadprodukci BRCA1Δ5 by tedy potenciálně mohla snižovat aktivitu HR.

Zajímavé je, že varianta BRCA1Δ10 nevykazovala v našem modelovém systému žádný vliv na změnu aktivity HR (Obr. XV). Vzhledem k tomu, že exon 10 kóduje více než polovinu proteinu, tak by se dalo očekávat, že BRCA1Δ10 bude na aktivitu HR mít vliv. Také proto, že centrální region, který je z největší části kódován právě exonem 10, je důležitý pro vazbu některých interakčních partnerů zapojujících se do HR (Matsuoka et al., 2007; Huen et al., 2009). Naše výsledky nekorespondují s dřívějšími studiemi, kdy delece exonu 10 měly zřejmý vliv na HR. V genomech buněk použitých v těchto studiích docházelo vlivem delece exonu 10 k mutacím a chromosomovým přestavbám. Při pokusech na myších docházelo delecemi exonu 10 ke tvorbě tumorů (Huber et al., 2001; Xu et al., 2001; Masuda et al., 2016). Tyto studie se ale zabývaly kompletními delecemi exonu 10. V našich modelových systémech byl přítomen mimo over-exprimovaného BRCA1Δ10 i endogenní

wtBRCA1. Naše výsledky by tedy mohly naznačovat, že v přítomnosti wtBRCA1 se BRCA1 Δ 10 do místa DSB neváže a tudíž neovlivňuje HR.

Narušení proteinu BRCA1 a rozpad BRCA1-B komplexu podle studie Dr. Dohrnové a jejích kolegů zvyšuje opravy DSB pomocí chybového alt-NHEJ (Dohrn et al., 2012). BRCA1 také stabilizuje a směřuje heterodimer Ku70-Ku80 v G1 fázi BC do místa DSB. Na heterodimeru Ku70-Ku80 je závislý méně chybový NHEJ (Jiang et al., 2013). V našem modelovém systému jsme nedetekovali vliv žádné z vyšetřovaných AS variant na chybovost NHEJ (Obr. XV). Vysvětlením může být to, že BRCA1 Δ 5 ani BRCA1 Δ 10 nenarušují sestavení ani aktivaci BRCA1-B komplexu v S fázi BC. Nejspíš také nemají vliv na stabilizaci heterodimeru Ku70-Ku80 v G1 fázi. Při selhání BRCA1 v G1 nebo S fázi BC by v obou případech mělo dojít k chybové opravě mechanismem alt-NHEJ (Jiang et al., 2013; Dohrn et al., 2012).

Práce s kontrolními buňkami odpovídala výsledkům získaným v dřívější studii (Kass et al., 2013). Over-exprese wtBRCA1 zvyšuje aktivitu HR a naopak down-regulace exprese BRCA1 aktivitu HR snižuje. Ovšem over-exprese ani down-regulace exprese wtBRCA1 neměla v našem modelovém systému vliv na chybovost NHEJ (Obr. XV). Pro chybovost NHEJ tedy nejspíš není kritická koncentrace BRCA1 v buňce.

Vzhledem ke své hlavní funkci v opravě DSB se BRCA1 vyskytuje přednostně v jádře (Ruffner and Verma, 1997). Jelikož jsme zjistili, že BRCA1 Δ 5 snižuje aktivitu HR, důvodem by mohla být její odlišná lokalizace. Fluorescenční mikroskopie ale odhalila, že v našich modelových buňkách linie MCF7, má BRCA1 Δ 5 stejnou lokalizaci jako wtBRCA1, tedy přednostně jadernou (Obr. XVIa – c). Z toho lze vyvodit, že delece exonu 5 nepostihuje vazbu BRCA1 k BARD1. NES totiž nejsou kódovány exonem 5 (Rodriguez and Henderson, 2000; Thompson et al., 2005). Pokud by nedocházelo k jejich maskování vazbou k BARD1, byla by zvýšená lokalizace BRCA1 Δ 5 v cytoplasmě.

Signální sekvence zodpovědné za import BRCA1 do jádra se zase nachází v centrálním regionu. Jsou dokonce kódovány exonem 10 (Thakur et al., 1997). Dalo by se tedy předpokládat, že přednostní lokalizace AS varianty BRCA1 Δ 10 bude cytoplasmatická. Odpovídala by tomu i nedetekovaná změna aktivity HR vlivem BRCA1 Δ 10. Tento předpoklad ale fluorescenční mikroskopie nepotvrdila. AS varianty BRCA1 Δ 10 byla lokalizovaná v jádře stejně jako wtBRCA1 (Obr. XVIc – e). Toto zjištění je v rozporu

s dřívějším zjištěním, že AS varianta BRCA1 postrádající exon 10 je v 90 % lokalizovaná v cytoplasmě (Fabbro et al., 2004). Naopak naše výsledky korespondují se studií na myších (Huber et al., 2001). Byla zde vyšetřována lokalizace endogenní BRCA1 Δ 10, která byla ko-lokalizovaná v jádře s wtBRCA1. Vzhledem k aktivnímu transportu proteinu BRCA1 v závislosti na aktuálním stavu buňky je však nutné provést detailní stanovení intracelulární dynamiky BRCA1 a jednotlivých AS variant v závislosti na poškození DNA, nebo aktuální fázi buněčného cyklu.

7 Závěr:

Metodou PCR sestřihu byly připraveny alternativní sestřihové varianty genu BRCA1 – BRCA1 Δ 5 a BRCA1 Δ 10. Tyto varianty byly zaklonovány do expresního vektoru pcDNA3.1 Hygro a pm-Cherry-C1.

Buňky modelového systému U-2 OS byly transfekovány vektorem pcDNA3.1 nesoucím vyšetřované AS varianty. Buňky modelového systému MCF7 byly transfekovány vektorem pm-Cherry-C1 nesoucím vyšetřované varianty. Exprese AS variant byla v buňkách modelového systému potvrzena western blottingem a to simultánně na buňkách použitých pro *in vitro* DNA reparační analýzu.

Byl stanoven vliv AS variant na aktivitu homologní rekombinace (HR) a nehomologního spojování volných konců (NHEJ). Jako kontrolní buňky byly použity netransfekované buňky, buňky se zvýšenou a buňky se sníženou expresí endogenní wtBRCA1. Výsledky ukazují, že BRCA1 Δ 5 statisticky významně snižuje aktivitu HR, ale na NHEJ vliv nemá. Vliv na HR navíc vykazoval známky dominantně negativní regulace. BRCA1 Δ 10 neovlivňuje HR, ani na NHEJ.

Pomocí fluorescenční mikroskopie byla stanovena intracelulární lokalizace AS variant. Proteiny AS variant byly fúzovány s fluorescenčním proteinem (červeným fluorescenčním proteinem m-Cherry BRCA1 Δ 5 a BRCA1 Δ 10; žlutým fluorescenčním proteinem YFP wtBRCA1). Modelové buňky byly transfekovány AS variantami i wtBRCA1 značeným žlutým fluorescenčním proteinem YFP. Přesto, že BRCA1 Δ 5 ovlivňuje HR, důvodem není změna buněčné lokalizace. BRCA1 Δ 5 byla lokalizována v cytoplasmě stejně jako wtBRCA1. BRCA1 Δ 10 postrádá exon kódující nukleární lokalizační signál. Ztráta tohoto signálu ovšem neměla vliv na buněčnou lokalizaci této AS varianty, která byla také lokalizována v jádře.

Výsledky z našeho modelového systému naznačují, že exon 5 je významný pro funkci proteinu při HR. Přesto, že exon 10 kóduje nadpoloviční většinu proteinu, do kterého je cílena řada vazeb BRCA1 s interakčními proteiny, nemá BRCA1 Δ 10 vliv na HR. Pro opravu mechanismem NHEJ není zásadně důležitý exon 5 ani exon 10. Výsledky této práce ukazují, že aberantní sestřih BRCA1 může negativně ovlivňovat proces opravy DNA a potenciálně tak přispívat k ztrátě genomové integrity.

8 Literatura:

- Atipairin, A., Canyuk, B., and Ratanaphan, A.** (2010). Cisplatin Affects the Conformation of Apo Form, not Holo Form, of BRCA1 RING Finger Domain and Confers Thermal Stability. *Chem. Biodivers.* **7**: 1949–1967.
- Bachelier, R., Vincent, A., Mathevet, P., Magdinier, F., Lenoir, G.M., and Frappart, L.** (2002). Retroviral transduction of splice variant Brca1- Δ 11 or mutant Brca1-W1777Stop causes mouse epithelial mammary atypical duct hyperplasia. *Virchows Arch.* **440**: 261–266.
- Bienstock, R.J., Darden, T., Wiseman, R., Pedersen, L., and Barrett, J.C.** (1996). Molecular modeling of the amino-terminal zinc ring domain of BRCA1. *Cancer Res.* **56**: 2539–2545.
- Bindra, R.S., Goglia, A.G., Jasin, M., and Powell, S.N.** (2013). Development of an assay to measure mutagenic non-homologous end-joining repair activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **41**: e115–e115.
- Blanchette, M. and Chabot, B.** (1999). Modulation of exon skipping by high-affinity hnRNP A1-binding sites and by intron elements that repress splice site utilization. *EMBO J.* **18**: 1939–1952.
- Boise, L.H., Gonzblez-garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuaez, G., and Thompson, C.** (1993). b & x , a bcl-2-Related Gene That Functions as a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death. **74**: 597–606.
- Brodie, K.M. and Henderson, B.R.** (2010). Differential modulation of BRCA1 and BARD1 nuclear localisation and foci assembly by DNA damage. *Cell. Signal.* **22**: 291–302.
- Brodie, K.M. and Henderson, B.R.** (2012). Characterization of BRCA1 protein targeting, dynamics, and function at the centrosome: a role for the nuclear export signal, CRM1, and Aurora A kinase. *J. Biol. Chem.* **287**: 7701–16.
- Brzovic, P.S., Keefe, J.R., Nishikawa, H., Miyamoto, K., Fox, D., Fukuda, M., Ohta, T., and Klevit, R.** (2003). Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 5646–51.
- Brzovic, P.S., Meza, J., King, M.-C., and Klevit, R.E.** (1998). The Cancer-predisposing Mutation C61G Disrupts Homodimer Formation in the NH₂-terminal BRCA1 RING Finger Domain. *J. Biol. Chem.* **273**: 7795–7799.
- Brzovic, P.S., Rajagopal, P., Hoyt, D.W., King, M.-C., and Klevit, R.E.** (2001). Structure of a BRCA1–BARD1 heterodimeric RING–RING complex. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 833–837.
- Cáceres, J.F. and Kornblihtt, A.R.** (2002). Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease. *Trends Genet.* **18**: 186–193.
- Cáceres, J.F., Stamm, S., Helfman, D.M., and Krainer, A.R.** (1994). Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* **265**: 1706–9.
- Cantor, S.B., Bell, D.W., Ganesan, S., Kass, E.M., Drapkin, R., Grossman, S., Wahrer, D.C.R., Sgroi, D.C., Lane, W.S., Haber, D.A., and Livingston, D.M.** (2001). BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* **105**: 149–160.

- Cary, R.B., Peterson, S.R., Wang, J., Bear, D.G., Bradbury, E.M., and Chen, D.J.** (1997). DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 4267–72.
- Clark, F. and Thanaraj, T.A.** (2002). Categorization and characterization of transcript-confirmed constitutively and alternatively spliced introns and exons from human. *Hum. Mol. Genet.* **11**: 451–464.
- Clark, S.L., Rodriguez, A.M., Snyder, R.R., Hankins, G.D.V., and Boehning, D.** (2012). STRUCTURE-FUNCTION OF THE TUMOR SUPPRESSOR BRCA1. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **1**: 1–8.
- Coleman, K.A. and Greenberg, R.A.** (2011). The BRCA1-RAP80 complex regulates DNA repair mechanism utilization by restricting end resection. *J. Biol. Chem.* **286**: 13669–13680.
- Colombo, M. et al.** (2014). Comprehensive annotation of splice junctions supports pervasive alternative splicing at the BRCA1 locus: A report from the ENIGMA consortium. *Hum. Mol. Genet.* **23**: 3666–3680.
- Cotta-Ramusino, C. et al.** (2011). A DNA damage response screen identifies RHINO, a 9-1-1 and TopBP1 interacting protein required for ATR signaling. *Science* **332**: 1313–7.
- Cruz-García, A. et al.** (2014). BRCA1 accelerates CtIP-mediated DNA-end resection. *Cell Rep.* **9**: 451–9.
- Daley, J.M. and Sung, P.** (2014). 53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks. *Mol. Cell. Biol.* **34**: 1380–1388.
- DeFazio, L.G. et al.** (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* **21**: 3192–3200.
- Di, L.-J., Fernandez, A.G., De Siervi, A., Longo, D.L., and Gardner, K.** (2010). Transcriptional regulation of BRCA1 expression by a metabolic switch.
- Dohrn, L., Salles, D., Siehler, S.Y., Kaufmann, J., and Wiesmüller, L.** (2012). BRCA1-mediated repression of mutagenic end-joining of DNA double-strand breaks requires complex formation with BACH1. *Biochem. J.* **441**: 919–26.
- Doil, C. et al.** (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* **136**: 435–46.
- Easton, D.F., Bishop, D.T., Ford, D., and Crockford, G.P.** (1993). Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am. J. Hum. Genet.* **52**: 678–701.
- ElShamy, W.M. and Livingston, D.M.** (2004). Identification of BRCA1-IRIS, a BRCA1 locus product. *Nat. Cell Biol.* **6**: 954–967.
- Escribano-Díaz, C., Orthwein, A., Lie Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T.F., Tká, J.N., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D., Xu, D., and Durocher, D.** (2013). A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* **49**: 872–883.
- Fabbro, M., Rodriguez, J.A., Baer, R., and Henderson, B.R.** (2002). BARD1 Induces BRCA1 Intranuclear Foci Formation by Increasing RING-dependent BRCA1 Nuclear Import and Inhibiting BRCA1 Nuclear Export. *J. Biol. Chem.* **277**: 21315–21324.
- Fabbro, M., Schuechner, S., Au, W.W., and Henderson, B.R.** (2004). BARD1 regulates BRCA1 apoptotic function by a mechanism involving nuclear retention. *Exp. Cell Res.*

298: 661–673.

- Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S., and Pfeiffer, P.** (2000). DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res.* **28**: 2585–96.
- Feng, L., Huang, T., and Chen, J.** (2009). MERIT40 facilitates BRCA1 localization and DNA damage repair. *Genes Dev.* **23**: 719–728.
- Futreal, P.A., Liu, Q., Shattuck-Eidens, D., Cochran, C., Harshman, K., Tavtigian, S., Bennett, L.M., Haugen-Strano, A., Swensen, J., and Miki, Y.** (1994). BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* **266**: 120–2.
- Gong, Z., Kim, J.E., Leung, C.C.Y., Glover, J.N.M., and Chen, J.** (2010). BACH1/FANCI Acts with TopBP1 and Participates Early in DNA Replication Checkpoint Control. *Mol. Cell* **37**: 438–446.
- Gottlieb, T.M. and Jackson, S.P.** (1993). The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**: 131–142.
- Greenberg, R. a, Sobhian, B., Pathania, S., Cantor, S.B., Nakatani, Y., and Livingston, D.M.** (2006). Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1 / BARD1-containing complexes. *Genes Dev.* **20**: 34–46.
- Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P., and Lopez, B.S.** (2007). Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 20902–7.
- Gupta, R., Sharma, S., Sommers, J.A., Jin, Z., Cantor, S.B., and Brosh, R.M.** (2005). Analysis of the DNA Substrate Specificity of the Human BACH1 Helicase Associated with Breast Cancer. *J. Biol. Chem.* **280**: 25450–25460.
- Hall, J.M., Lee, M.K., Newman, B., Morrow, J.E., Anderson, L. a, Huey, B., and King, M.C.** (1990). Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* **250**: 1684–1689.
- Harkin, D.P., Bean, J.M., Miklos, D., Song, Y.-H., Truong, V.B., Englert, C., Christians, F.C., Ellisen, L.W., Maheswaran, S., Oliner, J.D., and Haber, D.A.** (1999). Induction of GADD45 and JNK/SAPK-Dependent Apoptosis following Inducible Expression of BRCA1. *Cell* **97**: 575–586.
- Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H., and Ohta, T.** (2001). The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J. Biol. Chem.* **276**: 14537–40.
- Henderson, B.R.** (2005). Regulation of BRCA1, BRCA2 and BARD1 intracellular trafficking. *BioEssays* **27**: 884–893.
- Henderson, B.R.** (2012). The BRCA1 Breast Cancer Suppressor: Regulation of Transport, Dynamics, and Function at Multiple Subcellular Locations. *Scientifica (Cairo)*. **2012**: 1–15.
- Hsu, L.C., Doan, T.P., and White, R.L.** (2001). Identification of a gamma-tubulin-binding domain in BRCA1. *Cancer Res.* **61**: 7713–8.
- Hsu, L.-C. and White, R.L.** (1998). BRCA1 is associated with the centrosome during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 12983–12988.
- Huber, L.J., Yang, T.W., Sarkisian, C.J., Master, S.R., Deng, C.X., and Chodosh, L.A.**

- (2001). Impaired DNA damage response in cells expressing an exon 11-deleted murine Brca1 variant that localizes to nuclear foci. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 4005–15.
- Huen, M.S., Sy, S.M., and Chen, J.** (2009). BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**.
- Huertas, P. and Jackson, S.P.** (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J. Biol. Chem.* **284**: 9558–65.
- Chen, L., Nievera, C.J., Lee, A.Y.-L., and Wu, X.** (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* **283**: 7713–20.
- Chen, X., Arciero, C.A., Wang, C., Broccoli, D., and Godwin, A.K.** (2006). BRCC36 is essential for ionizing radiation-induced BRCA1 phosphorylation and nuclear foci formation. *Cancer Res.* **66**: 5039–46.
- Chen, Y., Farmer, A.A., Chen, C.F., Jones, D.C., Chen, P.L., and Lee, W.H.** (1996). BRCA1 is a 220-kDa nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. *Cancer Res.* **56**: 3168–72.
- Choudhury, A.D., Xu, H., and Baer, R.** (2004). Ubiquitination and Proteasomal Degradation of the BRCA1 Tumor Suppressor Is Regulated during Cell Cycle Progression. *J. Biol. Chem.* **279**: 33909–33918.
- Jiang, G., Plo, I., Wang, T., Rahman, M., Cho, J.H., Yang, E., Lopez, B.S., and Xia, F.** (2013). BRCA1-Ku80 protein interaction enhances end-joining fidelity of chromosomal double-strand breaks in the G1 phase of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **288**: 8966–8976.
- Johnson, R.D. and Jasin, M.** (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.* **19**: 3398–407.
- Joukov, V. et al.** (2006). The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly. *Cell* **127**: 539–52.
- Kass, E.M., Helgadottir, H.R., Chen, C.-C., Barbera, M., Wang, R., Westermarck, U.K., Ludwig, T., Moynahan, M.E., and Jasin, M.** (2013). Double-strand break repair by homologous recombination in primary mouse somatic cells requires BRCA1 but not the ATM kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 5564–9.
- Kim, H., Huang, J., and Chen, J.** (2007). CCDC98 is a BRCA1-BRCT domain-binding protein involved in the DNA damage response. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**: 710–5.
- Kim, S.S., Cao, L., Lim, S.-C., Li, C., Wang, R.-H., Xu, X., Bachelier, R., and Deng, C.-X.** (2006). Hyperplasia and Spontaneous Tumor Development in the Gynecologic System in Mice Lacking the BRCA1- 11 Isoform. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 6983–6992.
- Kim, S.T., Lim, D.S., Canman, C.E., and Kastan, M.B.** (1999). Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J. Biol. Chem.* **274**: 37538–43.
- Kleiman, F.E. et al.** (2001). The BARD1-CstF-50 Interaction Links mRNA 3' End Formation to DNA Damage and Tumor Suppression. *Cell* **104**: 743–753.
- Kohtz, J.D., Jamison, S.F., Will, C.L., Zuo, P., Lührmann, R., Garcia-Blanco, M.A., and Manley, J.L.** (1994). Protein–protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**: 119–124.
- Krecic, A.M. and Swanson, M.S.** (1999). hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 363–371.

- Lander, E.S. et al.** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860–921.
- Laulier, C. et al.** (2011). Bcl-2 inhibits nuclear homologous recombination by localizing BRCA1 to the endomembranes. *Cancer Res.* **71**: 3590–602.
- Lieber, M.R., Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., and Mann, M.** (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**: 492–495.
- Van Der Looij, M., Cleton-Jansen, A.M., Van Eijk, R., Morreau, H., Van Vliet, M., Kuipers-Dijkshoorn, N., Olthoff, E., Cornelisse, C.J., and Devilee, P.** (2000). A sporadic breast tumor with a somatically acquired complex genomic rearrangement in BRCA1. *Genes Chromosom. Cancer* **27**: 295–302.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., and Weissman, A.M.** (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 11364–11369.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., Alt, F.W., and Chen, J.** (2006). MDC1 Maintains Genomic Stability by Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals. *Mol. Cell* **21**: 187–200.
- Lu, M. and Arriek, B.A.** (2000). Transactivation of the p21 promoter by BRCA1 splice variants in mammary epithelial cells: evidence for both common and distinct activities of wildtype and mutant forms. *Oncogene* **19**: 6351–60.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R.** (2002). Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination. *Cell* **108**: 781–794.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J.** (2007). RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell* **131**: 887–900.
- Maniccia, A.W. et al.** (2009). Mitochondrial localization, ELK-1 transcriptional regulation and growth inhibitory functions of BRCA1, BRCA1a, and BRCA1b proteins. *J. Cell. Physiol.* **219**: 634–41.
- Maréchal, A. and Zou, L.** (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**.
- Masuda, T., Xu, X., Dimitriadis, E.K., Lahusen, T., and Deng, C.-X.** (2016). “DNA Binding Region” of BRCA1 Affects Genetic Stability through modulating the Intra-S-Phase Checkpoint. *Int. J. Biol. Sci.* **12**: 133–143.
- Matlin, A.J., Clark, F., and Smith, C.W.J.** (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 386–398.
- Matsuoka, S. et al.** (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**: 1160–6.
- McCarthy, E.E., Celebi, J.T., Baer, R., and Ludwig, T.** (2003). Loss of Bard1, the heterodimeric partner of the Brca1 tumor suppressor, results in early embryonic lethality and chromosomal instability. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 5056–63.
- Miki, Y. et al.** (1994). A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science* (80-.). **266**: 66–71.

- Mok, M.T.S. and Henderson, B.R.** (2010). A comparison of BRCA1 nuclear localization with 14 DNA damage response proteins and domains: Identification of specific differences between BRCA1 and 53BP1 at DNA damage-induced foci. *Cell. Signal.* **22**: 47–56.
- Moore, M.J., Query, C.C., and Sharp, P.A.** (1993). 13 Splicing of Precursors to mRNA by the Spliceosome. *Cold Spring Harb. Monogr. Arch.* **24**: 303–357.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B., and Agard, D.A.** (1995). Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* **378**: 638–40.
- Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., Fischer, A., and de Villartay, J.-P.** (2001). Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency. *Cell* **105**: 177–186.
- O'Donovan, P.J. and Livingston, D.M.** (2010). BRCA1 and BRCA2: Breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis* **31**: 961–967.
- O'Neill, T., Dwyer, A.J., Ziv, Y., Chan, D.W., Lees-Miller, S.P., Abraham, R.H., Lai, J.H., Hill, D., Shiloh, Y., Cantley, L.C., and Rathbun, G.A.** (2000). Utilization of oriented peptide libraries to identify substrate motifs selected by ATM. *J. Biol. Chem.* **275**: 22719–27.
- Okada, S. and Ouchi, T.** (2003). Cell cycle differences in DNA damage-induced BRCA1 phosphorylation affect its subcellular localization. *J. Biol. Chem.* **278**: 2015–2020.
- Orban, T.I. and Olah, E.** (2003). Emerging roles of BRCA1 alternative splicing. *J Clin Pathol Mol Pathol* **56**: 191–197.
- Ossareh-Nazari, B., Gwizdek, C., and Dargemont, C.** (2001). Protein Export from the Nucleus. *Traffic* **2**: 684–689.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., and Bonner, W.M.** (1999). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* **10**: 886–95.
- Plans, V., Scheper, J., Soler, M., Loukili, N., Okano, Y., and Thomson, T.M.** (2006). The RING finger protein RNF8 recruits UBC13 for lysine 63-based self polyubiquitylation. *J. Cell. Biochem.* **97**: 572–82.
- Polato, F. et al.** (2014). CtIP-mediated resection is essential for viability and can operate independently of BRCA1. *J. Exp. Med.* **211**: 1027–36.
- Puget, N., Gad, S., Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O.M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G.M., and Mazoyer, S.** (2002). Distinct BRCA1 Rearrangements Involving the BRCA1 Pseudogene Suggest the Existence of a Recombination Hot Spot. *Am. J. Hum. Genet.* **70**: 858–865.
- Qin, Y., Xu, J., Aysola, K., Begum, N., Reddy, V., Chai, Y., Grizzle, W.E., Partridge, E.E., Reddy, E.S.P., and Rao, V.N.** (2011). Ubc9 mediates nuclear localization and growth suppression of BRCA1 and BRCA1a proteins. *J. Cell. Physiol.* **226**: 3355–67.
- Quinn, J.E., Kennedy, R.D., Mullan, P.B., Gilmore, P.M., Carty, M., Johnston, P.G., and Harkin, D.P.** (2003). BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* **63**: 6221–8.
- Rass, E., Grabarz, A., Plo, I., Gautier, J., Bertrand, P., and Lopez, B.S.** (2009). Role of

- Mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 819–824.
- Rodriguez, J.A. and Henderson, B.R.** (2000). Identification of a Functional Nuclear Export Sequence in BRCA1. *J. Biol. Chem.* **275**: 38589–38596.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M.** (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**: 5858–5868.
- Romero, A. et al.** (2015). BRCA1 Alternative splicing landscape in breast tissue samples. *BMC Cancer* **15**: 219.
- Ruffner, H. and Verma, I.M.** (1997). BRCA1 is a cell cycle-regulated nuclear phosphoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 7138–43.
- Russell, P.A., Pharoah, P.D.P., De Foy, K., Ramus, S.J., Symmonds, I., Wilson, A., Scott, I., Ponder, B.A.J., and Gayther, S.A.** (2000). Frequent loss of BRCA1 mRNA and protein expression in sporadic ovarian cancers. *Int. J. Cancer* **87**: 317–321.
- Sankaran, S., Starita, L.M., Groen, A.C., Ko, M.J., and Parvin, J.D.** (2005). Centrosomal microtubule nucleation activity is inhibited by BRCA1-dependent ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 8656–68.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P.** (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**: 509–514.
- Scully, R., Ganesan, S., Vlasakova, K., Chen, J., Socolovsky, M., and Livingston, D.M.** (1999). Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol. Cell* **4**: 1093–9.
- Sevcik, J. et al.** (2013). Expression of human BRCA1^{Δ17-19} alternative splicing variant with a truncated BRCT domain in MCF-7 cells results in impaired assembly of DNA repair complexes and aberrant DNA damage response. *Cell. Signal.* **25**: 1186–1193.
- Sevcik, J., Falk, M., Kleiblova, P., Lhota, F., Stefancikova, L., Janatova, M., Weiterova, L., Lukasova, E., Kozubek, S., Pohlreich, P., and Kleibl, Z.** (2012). The BRCA1 alternative splicing variant ^{Δ14-15} 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.* **24**: 1023–1030.
- Shen, H., Kan, J.L.C., and Green, M.R.** (2004). Arginine-Serine-Rich Domains Bound at Splicing Enhancers Contact the Branchpoint to Promote Prespliceosome Assembly. *Mol. Cell* **13**: 367–376.
- Schwacha, A. and Kleckner, N.** (1994). Identification of Joint Molecules That Form Frequently between Homologs but Rarely between Sister Chromatids during Yeast Meiosis. *Cell* **76**: 51–63.
- Schwartz, G.F. et al.** (2008). Proceedings of the International Consensus Conference on Breast Cancer Risk, Genetics, & Risk Management, April, 2007. In *Cancer* (Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company), pp. 2627–2637.
- Smith, C.W. and Valcárcel, J.** (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 381–388.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C.** (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76–85.

- Smith, T.M., Lee, M.K., Szabo, C.I., Jerome, N., McEuen, M., Taylor, M., Hood, L., and King, M.C.** (1996). Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res.* **6**: 1029–1049.
- Starita, L.M., Machida, Y., Sankaran, S., Elias, J.E., Griffin, K., Schlegel, B.P., Gygi, S.P., and Parvin, J.D.** (2004). BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 8457–66.
- Starita, L.M. and Parvin, J.D.** (2003). The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**: 345–350.
- Sung, P. and Robberson, D.L.** (1995). DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell* **82**: 453–461.
- Svendsen, J.M., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., O’Connell, B.C., Gygi, S.P., Elledge, S.J., and Harper, J.W.** (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 Assembles A Holliday Junction Resolvase and Is Required for DNA Repair. *Cell* **138**: 63–77.
- Sy, S.M.H., Huen, M.S.Y., and Chen, J.** (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 7155–60.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., and Takeda, S.** (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* **17**: 5497–508.
- Tamaro, C. et al.** (2012). BRCA1 exon 11 alternative splicing, multiple functions and the association with cancer. *Biochem. Soc. Trans.* **40**: 768–72.
- Tarapore, P., Hanashiro, K., and Fukasawa, K.** (2012). Analysis of centrosome localization of BRCA1 and its activity in suppressing centrosomal aster formation. <http://dx.doi.org/10.4161/cc.21396>.
- Thakur, S., Zhang, H.B., Peng, Y., Le, H., Carroll, B., Ward, T., Yao, J., Farid, L.M., Couch, F.J., Wilson, R.B., and Weber, B.L.** (1997). Localization of BRCA1 and a splice variant identifies the nuclear localization signal. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 444–52.
- Thompson, D., Easton, D.F., and Breast Cancer Linkage Consortium** (2002). Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**: 1358–65.
- Thompson, M.E., Robinson-Benion, C.L., and Holt, J.T.** (2005). An Amino-terminal Motif Functions as a Second Nuclear Export Sequence in BRCA1. *J. Biol. Chem.* **280**: 21854–21857.
- Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., and Shiloh, Y.** (2003). Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.* **22**: 5612–21.
- Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B.A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S.P., and Elledge, S.J.** (2007). Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science* **316**: 1194–8.
- Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., and Burge, C.B.** (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**: 470–6.
- Wang, H., Yang, E.S., Jiang, J., Nowsheen, S., and Xia, F.** (2010). DNA damage-induced cytotoxicity is dissociated from BRCA1’s DNA repair function but is dependent on its

- cytosolic accumulation. *Cancer Res.* **70**: 6258–67.
- Wang, R.-H., Yu, H., and Deng, C.-X.** (2004). A requirement for breast-cancer-associated gene 1 (BRCA1) in the spindle checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 17108–13.
- Williams, R.S., Green, R., and Glover, J.N.N.** (2001). Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 838–42.
- Wilson, P.F., Hinz, J.M., Urbin, S.S., Nham, P.B., and Thompson, L.H.** (2010). Influence of homologous recombinational repair on cell survival and chromosomal aberration induction during the cell cycle in γ -irradiated CHO cells. *DNA Repair (Amst).* **9**: 737–744.
- Wu, J.Y. and Maniatis, T.** (1993). Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75**: 1061–1070.
- Xia, Y., Pao, G.M., Chen, H.-W., Verma, I.M., and Hunter, T.** (2003). Enhancement of BRCA1 E3 Ubiquitin Ligase Activity through Direct Interaction with the BARD1 Protein. *J. Biol. Chem.* **278**: 5255–5263.
- Xie, J. et al.** (2012). FANCI/BACH1 Acetylation at Lysine 1249 Regulates the DNA Damage Response. *PLoS Genet.* **8**: e1002786.
- Xu, C.-F., Brown, M.A., Chambers, J.A., Griffiths, B., Nicolai, H., and Solomon, E.** (1995). Distinct transcription start sites generate two forms of *BRCA1* mRNA. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 2259–2264.
- Xu, C.F., Chambers, J. a, and Solomon, E.** (1997). Complex regulation of the BRCA1 gene. *J. Biol. Chem.* **272**: 20994–20997.
- Xu, X., Qiao, W., Linke, S.P., Cao, L., Li, W.M., Furth, P.A., Harris, C.C., and Deng, C.X.** (2001). Genetic interactions between tumor suppressors *Brc1* and p53 in apoptosis, cell cycle and tumorigenesis. *Nat. Genet.* **28**: 266–71.
- Yamane, K., Katayama, E., and Tsuruo, T.** (2000). The BRCT regions of tumor suppressor BRCA1 and of XRCC1 show DNA end binding activity with a multimerizing feature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**: 678–684.
- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., Rajewsky, K., and Alt, F.W.** (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* **449**: 478–482.
- Yu, X. and Gabriel, A.** (2003). Ku-dependent and Ku-independent end-joining pathways lead to chromosomal rearrangements during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**: 843–56.
- Yu, X. and Chen, J.** (2004). DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 9478–86.
- Yu, X., Chini, C.C.S., He, M., Mer, G., and Chen, J.** (2003). The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* **302**: 639–642.
- Yu, X., Jacobs, S.A., West, S.C., Ogawa, T., and Egelman, E.H.** (2001). Domain structure and dynamics in the helical filaments formed by RecA and Rad51 on DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 8419–24.