

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární biologie a genetika eukaryot



**Bc. Martin Volek**

Vliv transkripčních regulačních elementů na sestřih pre-mRNA  
Influence of transcription regulatory elements on pre-mRNA splicing

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Mgr. David Staněk, Ph.D.

Praha 2018

## **Prohlášení:**

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

V Praze,

Podpis:

Martin Volek

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych chtěl velmi poděkovat doc. Mgr. Davidu Staňkovi, Ph.D., Mgr. Michaele Krausové, Ph.D. a bc. Zuzaně Klusoňové.

Doc. Mgr. Davidu Staňkovi, Ph.D. děkuji za přátelskou pracovní atmosféru, kterou vytvořil svou jedinečnou osobností, humorem a entusiasmem. Dále bych mu chtěl poděkovat za odborné vedení, za pomoc při interpretaci výsledků, za pomoc při sepsování této diplomové práce a za věcné kritické myšlení, které se mi v průběhu let strávených pod jeho vedením snažil vštípit. Mgr. Michaele Krausové, Ph.D. děkuji za pomoc při predikci transkripčního enhanceru genu *FNI* a s přípravou CRISPR/Cas9 systému. Bc. Zuzaně Klusoňové chci poděkovat za to, že si mou práci přečetla a opravila chyby, kterých jsem se dopustil. Také bych chtěl poděkovat všem členům laboratoře Biologie RNA z Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i. za velmi přátelskou atmosféru, ve které bylo příjemné pracovat.

Poslední a nejdůležitější poděkování patří mým rodičům Janě Volkové a Miroslavu Volkovi za pochopení, laskavost a podporu, kterou mi věnovali v průběhu mých studií.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky z projektu: Centrum biologie RNA č. P305-12-G034.

## ABSTRAKT

Při sestřihu pre-mRNA jsou z pre-mRNA odstraněny introny a dochází ke spojení exonů. Současné studie dokazují, že až 95 % genů, které mají více než dva exony, se mohou účastnit alternativního sestřihu pre-mRNA, tedy procesu, při kterém může či nemusí dojít k zahrnutí exonu do výsledné mRNA. Většina sestřihu pre-mRNA se uskutečňuje kotranskripčně, tedy v době, kdy je RNA polymeráza II stále spojena s pre-mRNA. Alternativní sestřih je velmi komplikovaný a komplexní proces, který probíhá v blízkosti DNA a histonů, jež mohou tento proces ovlivňovat.

Předchozí studie validovaly gen fibronektinu (*FNI*) a jeho alternativní exony EDA a EDB (extra doména A a B) jako vhodné modely pro studium alternativního sestřihu. Studie používající minireportérový systém *FNI* skládající se z exonu EDA, dvou sousedních intronů a exonů dokázaly, že při vnesení transkripčního enhanceru SV40 před promotor tohoto systému, dochází ke snížení zahrnutí exonu EDA ve výsledné mRNA. Není však známo, zda obdobný mechanismus funguje i mimo reportérový systém v genomu a zda vzdálené transkripční regulační elementy mohou mít vliv na alternativní sestřih.

Proto byl pomocí programů The Ensemble Regulatory Build a FANTOM 5 identifikován potenciální transkripční enhancer, který se nachází 23,5 kbp před místem začátku transkripce (TSS) pro gen *FNI*. Jeho nejdelší predikovaná varianta měla 2 401 bp. Použitím CRISPR/Cas9 technologie se podařilo připravit tři linie odvozené od HeLa buněk, ze kterých byl tento transkripční element odstraněn.

Použitím kvantitativní a semikvantitativní PCR bylo zjištěno, že ve všech připravených HeLa KO liniích vzrůstá transkripce genu *FNI* a výrazně klesá míra zahrnutí alternativního exonu EDB do výsledné mRNA. Deletovaná oblast byla tedy transkripčním represorem nikoli enhancerem, který zároveň moduluje alternativní sestřih. Výsledky tak ukazují, že alternativní sestřih může být ovlivňován i značně vzdálenými regulačními úseky DNA, které mohou napomáhat vzniku určité sestřihové varianty mRNA.

**Klíčová slova:** alternativní sestřih pre-mRNA, transkripční represor, gen *FNI*, exon EDB, CRISPR/Cas9

## ABSTRACT

In the process of pre-mRNA splicing introns are removed from pre-mRNA and exons are joined together. Current studies show, that about 95 % of genes, which contain more than two exons, can undergo alternative splicing. In this process some exons are included in or excluded from the final mRNA. Majority of pre-mRNA splicing take place co-transcriptionally at this time RNA polymerase II is still attached to pre-mRNA. Alternative splicing is complex process that takes place in a close proximity of DNA and histones that might modulate alternative splicing decisions.

Further studies have validated fibronectin gene (*FNI*) and his alternative exons EDA and EDB (extra domain A and B) as suitably model for studying alternative splicing. Study using *FNI* minigene reporter system, which is composed from EDA exon and two surrounding introns and exons, has proved that insertion of transcription enhancer SV40 in front of promotor, the level of EDA inclusion is decreased. So far, has not been proved if this mechanism can function in real genome context and if distal transcription elements can influence alternative splicing.

In this study, we have predicted transcription enhancer for *FNI* gene by using The Ensemble Regulatory Build and FANTOM 5. The predicted transcription enhancer, is located 23,5 kbp upstream of TSS for *FNI* gene and was 2 401 bp long. We have prepared by using CRISPR/Cas9 system three HeLa cell lines, from which was this transcription element removed.

Results from quantitative and semiquantitative PCR showed, that after removal of predicted transcription enhancer, increase level of transcription of *FNI* gene in all prepared clones. More importantly the deleted sequence wasn't transcription enhancer, but transcription silencer. From our results we concluded, that alternative splicing can be influenced even by distal transcription regulatory elements, which can promote splicing of one alternative splicing variant.

**Key words:** alternative splicing, transcription silencer, *FNI* gene, EDB exon, CRISPR/Cas9

# OBSAH

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>OBSAH.....</b>	<b>6</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>8</b>
<b>1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY .....</b>	<b>10</b>
1.1 Objevení intronů a sestřihu pre-mRNA.....	11
1.2 Spliceosom a mechanismus sestřihu pre-mRNA .....	13
1.3 Kotranskripční sestřih pre-mRNA .....	19
1.4 Alternativní sestřih .....	21
1.4.1 Role SR a hnRNP proteinů v alternativním sestřihu.....	23
1.4.2 Alternativní sestřih a transkripce.....	23
1.4.3 Chromatin, histonové modifikace a alternativní sestřih.....	25
1.4.4 Regulační elementy DNA a jejich vliv na elternativní sestřih.....	28
1.5 Fibronektin ( <i>FNI</i> ) – modelový gen pro studium alternativního sestřihu pre-mRNA .....	30
1.6 CRISPR/Cas9 – historie a mechanismus .....	32
<b>2. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>34</b>
<b>3. MATERIÁL.....</b>	<b>35</b>
3.1 Použité chemikálie .....	35
3.2 Použité enzymy .....	36
3.3 Pufry a média .....	37
3.4 Buněčné kultury .....	37
3.5 Seznam použitých oligonukleotidů .....	38
3.6 Přístroje.....	39
<b>4. METODY .....</b>	<b>41</b>
4.1 Horizontální gelová agarózová elektroforéza.....	41
4.2 Transformace kompetentních bakterií <i>E. coli DH5a</i> teplotním šokem.....	42
4.3 Izolace genomové DNA.....	42
4.4 Izolace RNA.....	43
4.4.1 Precipitace RNA.....	43
4.4.2 Ošetření izolované RNA pomocí DNasyI.....	44
4.5 Reverzní transkriptase – syntéza cDNA .....	44
4.6 Tkáňové kultury .....	44
4.7 Transfekce HeLa buněk plazmidy.....	45
4.8 Izolace plazmidové DNA, DNA z gelu, produktů PCR.....	46
4.9 Sekvenační analýza .....	46
4.10 PCR.....	46
4.10.1 Charakterizace HeLa KO linií.....	47
4.10.2 Semikvantitativní PCR na detekci množství exonu <i>EDB</i> .....	48
4.10.3 PCR pro přípravu plazmidu nesoucího 5'gRNA a 3'gRNA.....	49
4.11 RT-qPCR.....	51
4.12 CRISPR/Cas9 – testování funkčnosti gRNA .....	52
4.13 Selektce HeLa buněk pomocí průtokové cytometrie.....	53
4.14 Predikce transkripčního enhanceru pro gen <i>FNI</i> .....	54

<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>55</b>
5.1 Predikce transkripčního enhanceru .....	55
5.2 Návrh gRNA .....	56
5.3 Příprava CRISPR/Cas9 systému .....	57
5.4 Testování funkčnosti gRNA.....	59
5.5 Selektce buněk průtokovou cytometrií.....	61
5.6 Identifikace HeLa KO linií.....	62
5.7 Semikvantitativní PCR pro detekci exonu EDB .....	64
5.8 Relativní transkripce genu FN1.....	66
5.9 Alternativní sestřih exonu EDB u HeLa KO linií .....	67
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>68</b>
<b>7. ZÁVĚR.....</b>	<b>71</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>72</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3'SS	3'- sestřihové místo (z angl. splice site)
5'SS	5'- sestřihové místo (z angl. splice site)
ADB	Agarose Dissolving Buffer
BS	místo větvení (z angl. branch site)
BSA	hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumin)
Cas9	s CRISPR asociující protein 9 (z angl. CRISPR-associated protein 9)
CBP	protein vázající CREB (z angl. CREB binding protein)
cDNA	komplementární DNA (z angl. complementary DNA)
CTD	C-terminální doména
CREB	protein vázající CRE (z angl. CRE binding protein)
CRISPR	z angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRISPR RNA
DSB	dvojláknový zlom DNA (z angl. double strand break)
DMEM	Dobbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose
DMSO	dimetylsulfoxid
EDA	extra doména A (z angl. extra domain A)
EDB	extra doména B (z angl. extra domain B)
ECM	extracelulární matrix
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
Ef	efektivita amplifikace při kvantitativní PCR
EM	elektronová mikroskopie
ESE	exonový sestřihový enhancer (z angl. exonic splicing enhancer)
ESS	exonový sestřihový represor (z angl. exonic splicing silencer)
FBS	telecí hovězí sérum (z angl. fetal bovine serum)
<i>FNI</i>	fibronektin
GAPDH	glyceraldehyd-6-fosfátdehydrogenasa
gDNA	genomová DNA



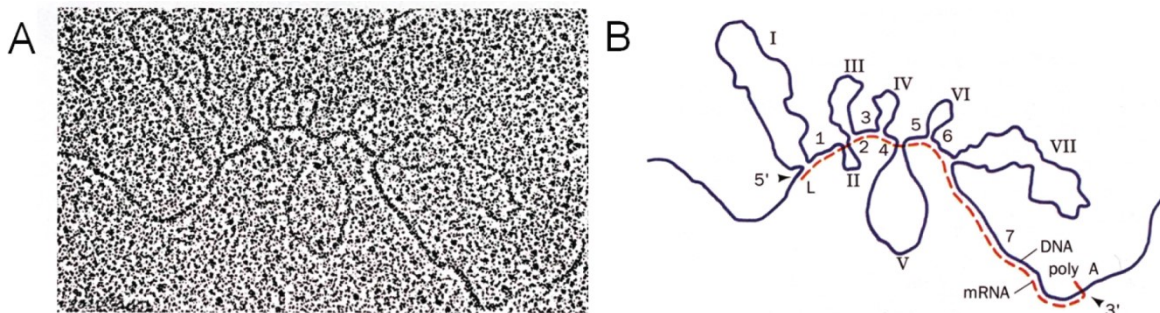
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
HAT	histonová acetyltransferáza
HDAC	histonová deacetyláza
HDR	oprava pomocí homologní rekombinace (z angl. homology direct repair)
hnRNP	heterogenní jaderné ribonukleoproteiny (z angl. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)
NHEJ	nehomologní oprava a spojení DNA (z angl. non-homologous and joining)
PAM	z angl. protospacer adjacent motif
PPT	polypyrimidinový úsek (z angl. polypyrimidine track)
PTB protein	protein vázající polypyrimidinový úsek (z angl. polypyrimidine track binding protein)
R	purimová báze
RFP	červený fluorescenční protein (z angl. red fluorescent protein)
RNA pol II	DNA dependentní RNA polymeráza II
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolution per minute)
RRM	doména vázající RNA (z angl. RNA recognition motive)
SEM	střední chyba průměru (z angl. Standard error of the mean)
sgRNA	z angl. single guide RNA
snRNA	malá jaderná RNA (z angl. small nuclear RNA)
snRNP	malá jaderná ribonucleoproteinová částice (z angl. small ribonucleoprotein particle)
SR protein	protein bohatý na Serin/Arginin
SV40	<i>simian</i> virus 40
v/v	poměr objem/objem
w/v	poměr hmota/objem
Y	pyrimidinová báze

# 1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY

V průběhu genové exprese je DNA přepisována do RNA a tato nově vznikající RNA se označuje jako prekurzorová mRNA (pre-mRNA). V eukaryotických organizmech pre-mRNA obsahuje kromě exonů, protein kódujících oblastí, i nekódující oblasti zvané introny. K tomu, aby eukaryotická pre-mRNA mohla být translatována do proteinu, musí dojít k vystřížení intronů a spojení exonů dohromady. Tento proces se nazývá sestřih pre-mRNA a v určité míře se odehrává ve všech eukaryotických buňkách. Některé exony se ve výsledné mRNA objevují vždy, a jsou proto označovány jako konstitutivní. Některé exony se ale ve výsledné mRNA vyskytují pouze za specifických podmínek, a jsou proto označovány jako exony alternativní. Tento proces se označuje jako alternativní sestřih a umožňuje vzniknout rozdílným mRNA z jedné pre-mRNA. Jeden gen tak může sloužit jako templát (vzor) pro několik různých izoform proteinů s rozdílnou funkcí (Boise et al., 1993). Alternativní sestřih je u vyšších eukaryot velmi běžný a umožňuje tak z limitovaného množství genů získat velké množství proteinů. Množstvím genů podstupujících alternativní sestřih se vysvětluje fakt, že organizmy, které vykazují rozdílnou komplexitu, mají podobné množství genů. Například člověk má přibližně 19 000 genů, *Drosophila melanogaster* má 14 000 genů a *Caenorhabditis elegans* má 20 000 genů, ale 95 % lidských genů podstupuje alternativní sestřih, zatímco u *Drosophily melanogaster* je to 45 % a u *C. elegans* je to pouze 25 % (Barash et al., 2010; Khodor et al., 2011; Ramani et al., 2011). Regulace a přísná kontrola alternativního sestřihu je proto velmi důležitá pro správný vývoj organismu. Chyby v tomto procesu vedou ke vzniku závažných genetických onemocnění (Cooper et al., 2009; Huranová et al., 2009). Sestřih pre-mRNA tak musí probíhat správně, ale zároveň musí poskytovat dostatečnou volnost k tvorbě rozdílných izoform mRNA, k zajištění proteinové komplexity. V této práci budou popsány základní mechanizmy sestřihu pre-mRNA, možnosti jeho regulace a propojení s chromatinovými modifikacemi, transkripcí a regulačními elementy DNA.

## 1.1 Objevení intronů a sestřihu pre-mRNA

Do druhé poloviny 70. let 20. století byly struktura a způsob exprese eukaryotických genů považovány za podobné těm prokaryotickým. Předpokládalo se, že celá sekvence genu je translatována do proteinu. V roce 1977 bylo ale pomocí elektronové mikroskopie (EM) ukázáno, že při hybridizaci adenovirové nascentní mRNA s již procesovanou adenovirovou mRNA, určité sekvence nacházející se ve středu adenovirového genu, nejsou ve výsledné mRNA vůbec přítomny (viz Obrázek č. 1.1) (Berget et al., 1977). Tímto způsobem bylo dokázáno, že nascentní, 28 kbp dlouhá, adenovirová mRNA, prochází procesem, při kterém je její délka redukována. Rok od tohoto objevu byl obdobný proces poprvé detekován na genomové sekvenci a to konkrétně na genu myššího  $\beta$ -globinu (Konkel et al., 1978). Brzy začalo být zjevné, že většina eukaryotických genů není kontinuální. Bylo prokázáno, že eukaryotické geny se skládají z kódujících oblastí tzv. exonů a z dlouhých intronů, které jsou z pre-mRNA v jádře odstraněny pomocí procesu zvaného sestřih pre-mRNA.



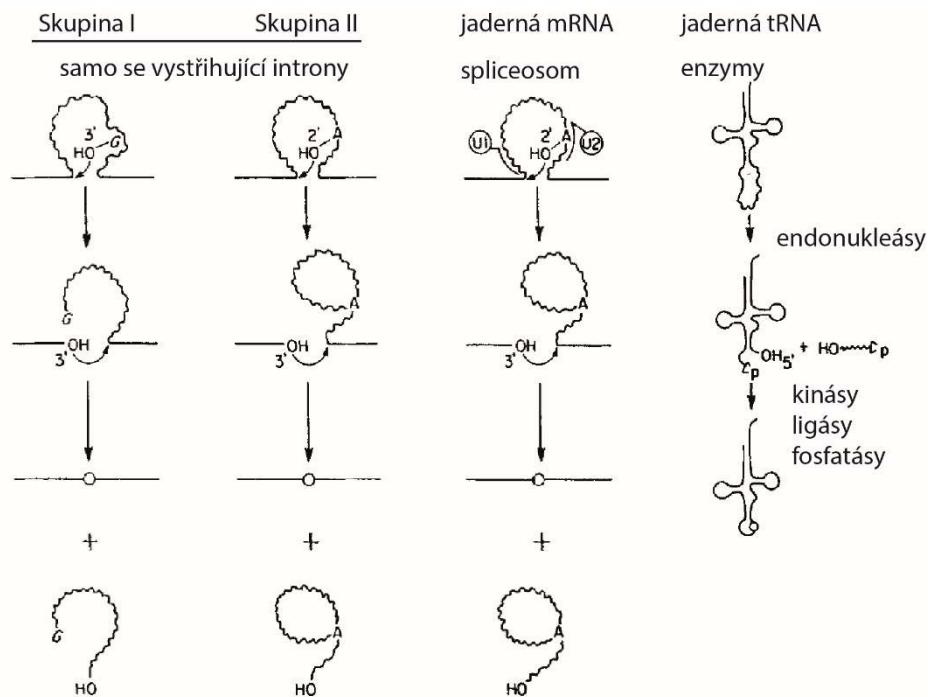
**Obrázek č. 1.1 Objevení sestřihu pre-mRNA**

(A) Snímek z EM zachycující hybridizaci nascentní mRNA s finální sestřiženou mRNA. (B) Schématické zobrazení předchozího snímku z EM. Upraveno z Sharp et al., 1977.

Ani v současné době není zcela zřejmé, jakým způsobem introny vznikly. Jednou z teorií je, že vznik intronů a sestřihu pre-mRNA byl zapříčiněn masivní invazí samovystřihujících se intronů skupiny II někdy v počátcích vzniku eukaryotických buněk. Tyto introny se byly schopny inkorporovat do sekvence do té doby kontinuálních genů. Z pre-mRNA se ale introny sami odstranily a tím nenarušily metabolismus buněk, a proto se mohly šířit dále v genomu. Postupem času však některé introny skupiny II ztratily schopnost sebe sama vystřihnout z pre-mRNA a to zapříčinilo vznik sestřihu pre-mRNA, který je řízený pomocí spliceosomu (Cech, 1986). Tuto teorii potvrzují zjištění, že introny se nacházejí i ve velmi vzdálených eukaryotických organizmech, jako jsou například protista (např. *Giardia*) či *Trichomonas vaginalis*. Dalším důkazem je to, že komponenty

spliceosomu byly prozatím nalezeny ve všech osekvenovaných eukaryotických genomech (Collins and Penny, 2005; Vanáčová et al., 2005).

Do současné doby bylo objeveno několik typů intronů s různými mechanismy vystřížení z pre-mRNA. Skupiny samovystřihujících se intronů I a II (dále označované jako Skupina intronů I a II) jsou velmi vzácné strukturované introny, které se nacházejí v bakteriích, v rRNA, v jádře protist, hub či rostlin a v organelách eukaryotických buněk (Tourasse et al., 2010). Tyto dva typy intronů jsou schopny fungovat jako ribozymy a jsou schopny katalyzovat své vlastní vystřížení. Tímto způsobem se skupina intronů II může šířit dále v genomu. Tato skupina je díky své velké podobnosti k spliceosomálním intronům považována za jejich předka (Lambowitz and Zimmerly, 2011). Dalším typem intronů jsou introny nacházející se v tRNA. Tyto introny jsou z tRNA vystříženy pouze pomocí proteinových enzymů. Nejpočetnější skupinou intronů jsou spliceosomální introny. Tyto introny jsou z pre-mRNA odstraňovány pomocí komplexu zvaného spliceosom. Mechanismus vystřížení intronů pomocí tohoto komplexu a jeho složení bude popsáno v následující kapitole. Schématické zobrazení rozdílných mechanismů vystřížení různých typů intronů je zobrazeno na Obrázku č. 1.2 (Cech, 1990).



**Obrázek č. 1.2 Mechanismus sestřihu pre-mRNA u rozdílných typů intronů**

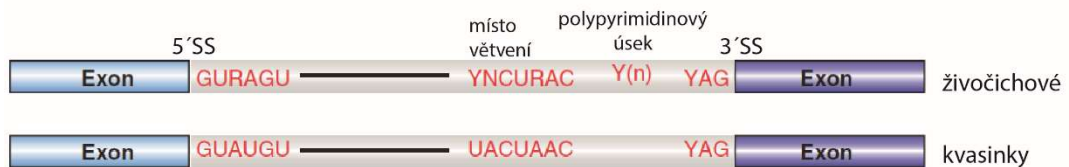
Vlnitá čára symbolizuje introny. Rovná čára představuje exony. Sestřihu pre-mRNA uskutečňovaného spliceosomem se účastní velké množství komponent, zde jsou vyobrazeny pouze částice snRNP U1 a U2. Upraveno z Cech, 1990.

## 1.2 Spliceosom a mechanismus sestřihu pre-mRNA

Nejběžnější typ intronů, tzv. spliceosomální je z pre-mRNA vystřihován pomocí obrovského multi-ribonukleoproteinového komplexu zvaného spliceosom (Lerner et al., 1980). Hlavní složkou spliceosomu jsou malé ribonukleoproteinové částice označované jako snRNP (z angl. small nuclear ribonucleoprotein particles). Klíčovou součástí částic snRNP jsou malé jaderné RNA (snRNA – z angl. small nuclear RNA) (Hinterberger et al., 1983).

Ve většině eukaryotických buněk můžeme nalézt dva typy spliceosomů: majoritní a minoritní. Majoritní spliceosom zajišťuje vystřížení většiny intronů. Rozpoznává introny, které na 5'konci začínají nukleotidy GU a na 3'konci končí nukleotidy AG. snRNP částice tvořící tento typ spliceosomu jsou částice snRNP U1, U2, U4, U5 a U6 (Matera and Wang, 2014). Minoritní spliceosom je naopak velmi vzácný a u obratlovců zajišťuje vystřížení méně než 0,5 % intronů a u nižších živočišných druhů je toto procento ještě nižší (Patel and Steitz, 2003). Introny rozpoznávané tímto typem spliceosomu začínají na 5'konci AT a na 3'konci končí AC. Minoritní spliceosom je tvořen částicemi snRNP U11, U12, U4atac, U5 a U6atac (Matera and Wang, 2014). Teorie o vzniku minoritního spliceosomu je založena na tom, že minoritní spliceosom vznikl v průběhu parazitické invaze eukaryotických buněk, které ale již obsahovaly majoritní typ spliceosomu. Jelikož minoritní spliceosom se účastní vystřížení méně než 0,5 % intronů, bude dále v této práci popisován a komentován pouze majoritní typ spliceosomu.

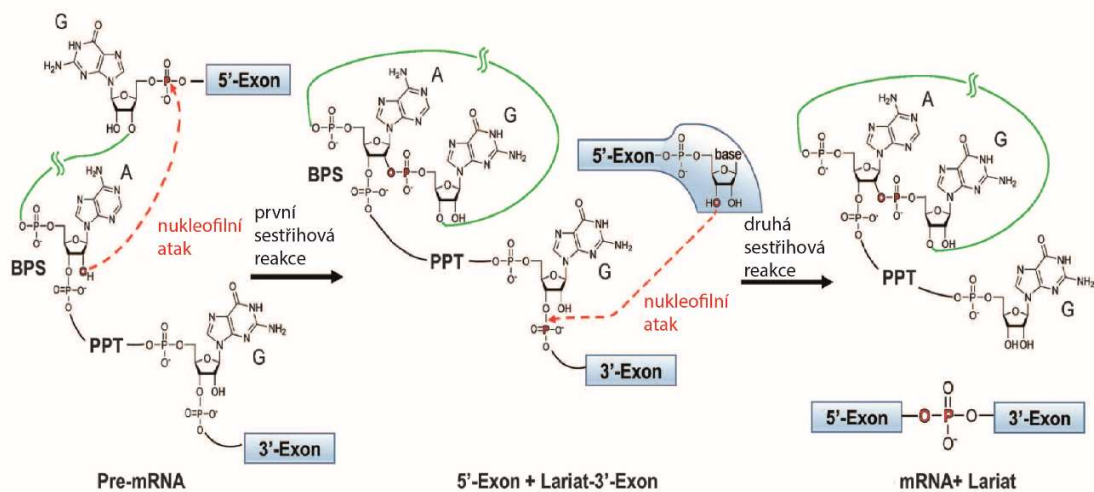
Předtím, než proběhne sestřih pre-mRNA určitého intronu, je nutné, aby tento intron byl spliceosomem rozpoznán a došlo ke správnému složení spliceosomu. Spliceosom se nad každým intronem skládá *de novo*. Ke správnému rozpoznání intronu napomáhají spliceosomu tři sekvence: 5'sestřihové místo (5'SS), 3'sestřihové místo (3'SS) a místo větvení tzv. branch point (BP). BP se obvykle nachází 18-40 nukleotidů proti směru transkripce od 3'SS. Ve vyšších eukaryotech je BP doprovázen polypyrimidinovým úsekem (tzv. polypyrimidin track, PPT) (Will and Lührmann, 2011) (viz Obrázek č. 1.3).



**Obrázek č. 1.3** Vyobrazení konzervovaných sekvencí intronů pro živočichy a kvasinky

Y = pyrimidin, R = purin, 5'SS = 5'sestřihové místo, 3'SS = 3'sestřihové místo, Upraveno z Will and Lührmann, 2011.

Chemická podstata sestřihu pre-mRNA je založena na dvou transesterifikačních reakcích, které mají mechanismus  $S_N2$  substitute. V prvním kroku dochází k nukleofilnímu útoku 2'-OH skupiny adeninu, který tvoří branch point, na fosfodiesterovou vazbu na 5'SS. Je zrušena vazba mezi exonem a 5'SS místem intronu. 5'-Exon má na svém 3' konci volnou 3'-OH skupinu. Ta v druhém kroku sestřihu pre-mRNA podniká druhý nukleofilní útok, tentokrát na fosfodiesterovou vazbu na 3'SS. Exony jsou touto reakcí spojeny dohromady a intron je při tomto procesu odstraněn v lasovité struktuře lariatu (viz Obrázek č. 1.4). Při těchto transesterifikačních reakcích není spotřebováno žádné ATP a bylo dokázáno, že tyto reakce jsou reverzibilní (Tseng and Cheng, 2008).

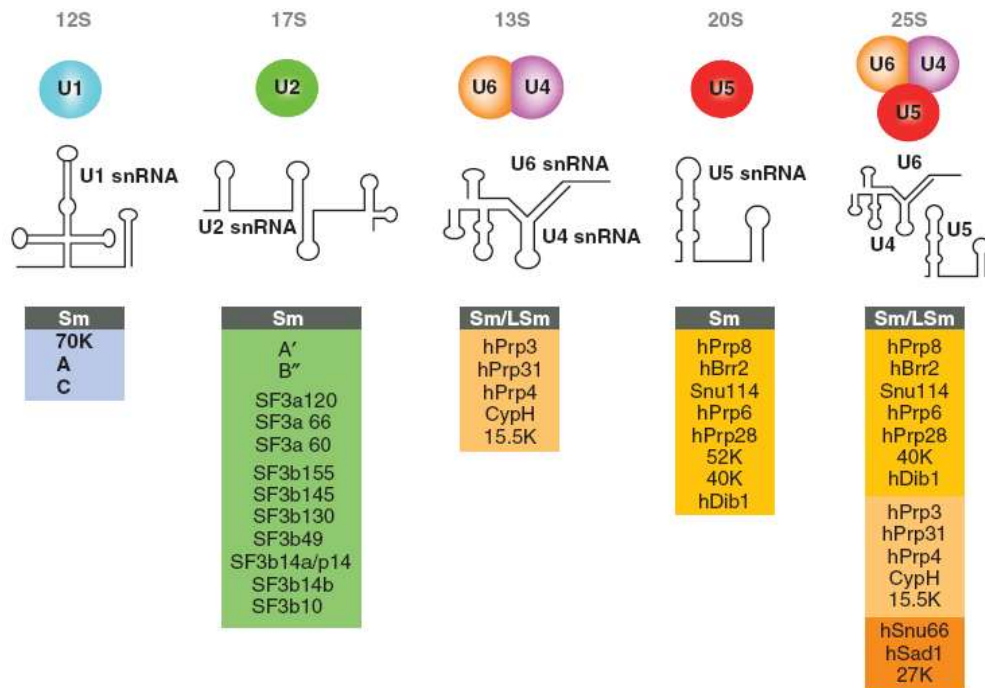


**Obrázek č. 1.4** Sestřih pre-mRNA

Schématické zobrazení dvou transesterifikačních reakcí, které zajišťují vystřížení intronu z pre-mRNA. V prvním kroku sestřihu pre-mRNA dochází na 5'SS k nukleofilnímu útoku 2'-OH skupiny adeninu nacházejícího se v pozici branch pointu. V druhém kroku sestřihu pre-mRNA, uvolněná 3'-OH na 5'-Exonu atakuje fosfodiesterovou vazbu na 3'SS. Dochází ke spojení exonu a odstranění intronu v podobě lariatu. Upraveno z Hang et al., 2015.

Ačkoliv je chemická podstata sestřihu pre-mRNA velmi prostá, spliceosom zajišťující tento proces *in vivo*, je mega-daltonový komplex skládající se z pěti částic snRNP U1, U2, U4/U6 a U5 a dalších 170 ne-snRNP proteinů (Bessonov et al., 2008; Jurica and Moore, 2003; Wahl et al., 2009). Role těchto ne-snRNP proteinů spočívá v zajištění správné konformace RNA tak, aby mohly proběhnout obě transesterifikační reakce dostatečně efektivně. Spliceosom je velmi dynamický komplex, který během sestřihu pre-mRNA mění jak svoji strukturu, tak i některé komponenty.

Klíčovou komponentou spliceosomu jsou částice snRNP, které se skládají z snRNA a proteinů. Sm proteiny se vyskytují u částic snRNP U1, U2, U4 a U5, společně tyto proteiny vytvářejí kruh kolem snRNA (tzv. Sm ring). Tyto proteiny slouží jako chaperony a zajišťují, aby snRNA zaujaly správnou sekundární strukturu. Stejnou funkci u částice snRNP U6 zastává skupina proteinů označovaných jako LSm proteiny, které tvoří tzv. LSm ring. Pomocí protilátky proti Sm proteinům se podařilo v roce 1979 profesorce Steizové izolovat všech 5 snRNA (Lerner and Steitz, 1979). A na základě sekvenční komplementarity mezi snRNA U1 a 5'SS o rok později v roce 1980 postulovala, že snRNA hrají důležitou roli v sestřihu pre-mRNA (Lerner et al., 1980). Tímto způsobem tak profesorka Steizová a Sm proteiny napomohly objasnění jednoho z nejdůležitějších procesů genové exprese. Každá částice snRNP obsahuje také set proteinů, které jsou pro ni specifické (viz Obrázek č. 1.5.). Tyto proteiny mají velmi rozdílné aktivity a mohou být použity k rozlišení mezi jednotlivými částicemi snRNP (Will and Lührmann, 2011).



**Obrázek č. 1.5 Částice snRNP – sekundární struktury snRNA a s nimi asociované proteiny**

Na obrázku jsou zobrazeny sekundární struktury jednotlivých snRNA a proteiny se kterými interagují. Zkratka Sm představuje proteiny, které jsou totožné pro snRNA U1, U2, U4, U5. Zkratka LSm představuje proteiny, které tvoří tzv. LSm ring kolem snRNA U6. V případě Sm proteinů, se jedná o proteiny Sm B/B', D3, D2, D1, E, F a G. V případě LSm proteinů, se jedná o proteiny Lsm2-8. Dále jsou v boxech vyznačeny proteiny, které jsou specifické pro jednotlivé snRNA. Nad jednotlivými částicemi snRNP je uvedena jejich velikost ve Svedbergech [S]. Upraveno z Will and Lührmann, 2011.

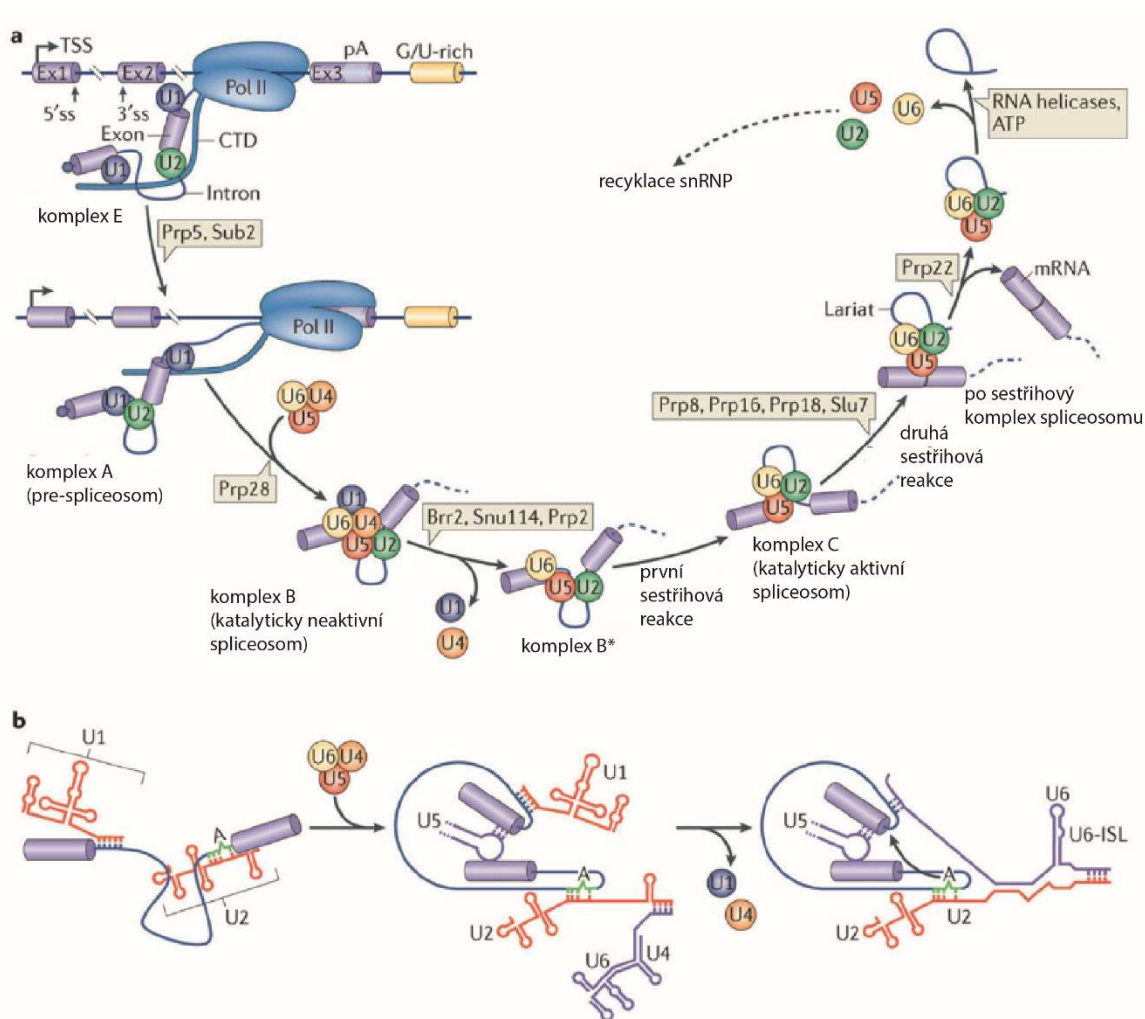
Spliceosom je přibližně stejně velký jako ribosom, narozdíl od něj ale není procesivní a musí se před každým vystřížením intronu zformovat *de novo*. To jakým způsobem se spliceosom nad intronem tvoří, bylo předmětem mnoha vědeckých diskuzí. Pokusy *in vivo*, ale potvrdily model tzv. postupného skládání spliceosomu (Staley and Woolford, 2009; Tardiff and Rosbash, 2006).

V prvním kroku se částice snRNP U1 váže na 5'SS. Tato vazba je umožněna párováním mezi pre-mRNA a snRNA U1 a interakcí proteinu U1C s 5'SS (Du and Rosbash, 2002). Tomuto párování napomáhá C-terminální doména (CTD) RNA pol II. CTD interaguje přímo s částicí snRNP U1, avšak funkce této interakce dosud není jasná (Görnemann et al., 2011). 3'SS na pre-mRNA je rozpoznáváno částicí snRNP U2, společně s proteiny SF1 (splicing factor 1) a U2AF (U2 auxiliary factor), formuje se komplex E (viz Obrázek č. 1.6). snRNA U2 rozpoznává BP a PPT a interaguje s částicí snRNP U1 a vytváří se komplex A. Duplex mezi snRNA U2 a adenosinem, který tvoří BP, vytváří vhodné prostředí k tomu, aby se 2'-OH skupina adenosinu mohla účastnit nukleofilního ataku a tedy prvního katalytického kroku sestřihu pre-mRNA (Will and



Lührmann, 2011). Než k tomu ale dojde, je nutné, aby s komplexem A asociovala částice tri-snRNP U4/U6, U5. Takto vzniká ještě katalyticky neaktivní komplex B. K přeměně komplexu B do jeho katalytické formy (komplex B\*) se musí uskutečnit značné kompoziční a konformační změny. V první řadě je zrušeno párování mezi snRNA U4/U6. snRNA U6 nahradí párování mezi snRNA U1 a 5'SS. Dále dochází ke vzniku duplexu mezi snRNA U6 a U2 a částice snRNP U1 a U4 opouštějí komplex B (Raghunathan and Guthrie, 1998; Sun and Manley, 1995). Komplex B\* je nyní katalyticky aktivní a v těsné blízkosti se zde nachází 5'SS a BP. Probíhá první reakce sestřihu pre-mRNA. Vzniká komplex C, který obsahuje volný exon 1 a intermediát intron-exon 2. Komplex C podstupuje další konformační změny, je zrušena například interakce mezi snRNA U6 a 5'SS, aby byl spliceosom následně schopný provést druhou reakci sestřihu pre-mRNA (Konarska et al., 2006). Po druhém katalytickém kroku se vytváří post-spliceosomální komplex, ten obsahuje intron ve formě lariatu a spojené exony. Nakonec jsou z post-spliceosomálního komplexu uvolněny částice snRNP U2, U5 a U6, které budou využity při dalším sestřihu pre-mRNA.

Ačkoliv oba katalytické kroky sestřihu pre-mRNA jsou zajišťovány pomocí snRNA, samy od sebe by se snRNA nebyly schopny dostat do katalyticky aktivní konformace (Fica et al., 2013). To zajišťují desítky až stovky proteinů, které se spliceosomem asociují v průběhu jednotlivých kroků sestřihu pre-mRNA. Proteiny tak hrají roli při rozpoznávání sestřihových míst a zajišťují správné kompoziční a konformační změny proteinů a snRNA. Sestřih pre-mRNA *in vivo* vyžaduje značné množství ATP. Oba katalytické kroky se na celkové spotřebě energie podílejí pouze malou částí a pokusy *in vitro* prokázaly, že mohou být reverzibilní (Tseng and Cheng, 2008). Většinu ATP spotřebovávají RNA helikázy řadící se do rodiny DexD/H RNA helikás, které zajišťují správnou konformaci snRNA (Cordin et al., 2012). Díky této spotřebě energie se předpokládá, že sestřih pre-mRNA *in vivo* je ireverzibilní, avšak tato teorie ještě musí být podložena dalšími studiemi (Matera and Wang, 2014).



### Obrázek č. 1.6 Model postupného skládání spliceosomu

Ke skládání spliceosomu dochází v místech aktivní transkripce.

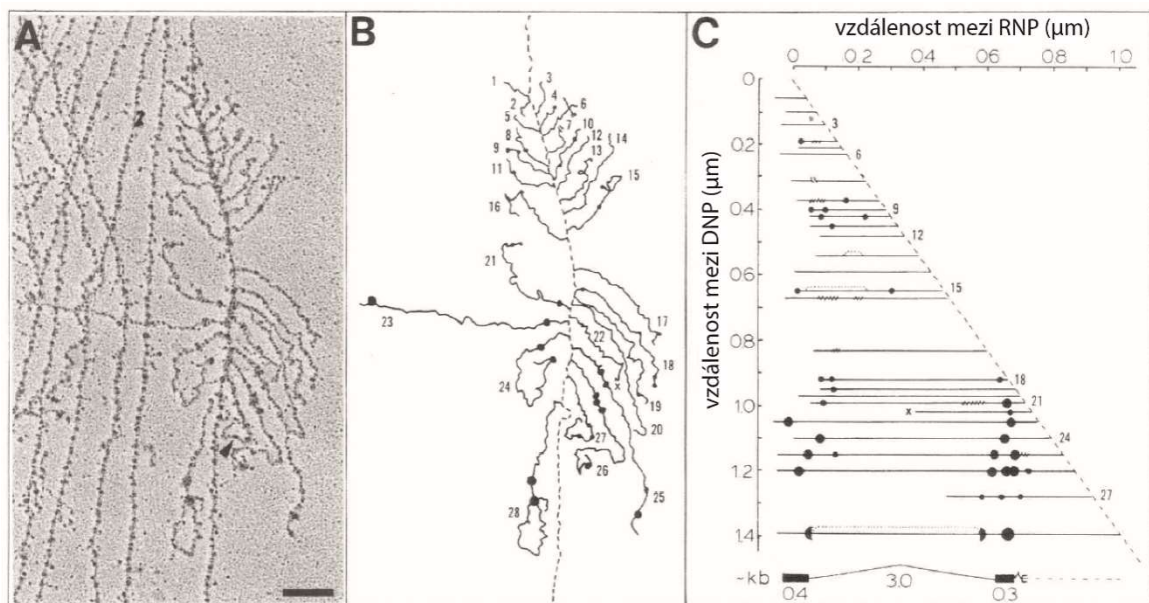
**(A)** Částice snRNP U1 a U2 asociují s pre-mRNA v 5'SS a 3'SS. Procesu napomáhá CTD RNA polymerázy II (Pol II). Částice snRNP U1 a U2 spolu interagují a vzniká komplex A. S komplexem A dále asociuje tzv. částice tri-snRNP U4-U6,U5 a vzniká tak komplex B. V tomto bodě dochází ke značným změnám v RNA-RNA interakcích a v konformacích proteinů. Výsledkem těchto změn je, že z komplexu B jsou uvolněny částice snRNP U1 a U4. Spliceosom se dostává do své katalyticky aktivní formy označované jako komplex B\*. Dochází k prvnímu katalytickému kroku. Spliceosom podstupuje další konformační změny a vzniká komplex C, při jehož uspořádání dochází k druhému katalytickému kroku. Vzniká tzv. post-spliceosom a z něj jsou uvolněny částice snRNP U2, U5 a U6, stejně tak i spojené exony a intron ve formě lariatu.

**(B)** Znárodnění konformačních změn snRNA v průběhu postupného skládání spliceosomu. Na začátku snRNA U1 asociuje s 5'SS a snRNA U2 asociuje se sekvencí branch pointu, takto jsou snRNA orientovány v komplexu A. Poté do spliceosomu přichází částice tri-snRNP U4-U6, U5. Na konformaci snRNA se to projeví novým párováním mezi snRNA U2 a U6 a párováním mezi snRNA U5 a sekvencí exonu v blízkosti 5'SS, vzniká komplex B. Následně spliceosom opouští snRNA 1 a 4. Poté je vytvořeno párování mezi snRNA U6 a U2 a vzniká tak katalyticky aktivní komplex B\*, který podstupuje první katalytický krok. Upraveno z Matera and Wang, 2014.

### 1.3 Kotranskripční sestřih pre-mRNA

Dlouhou dobu nebylo známé, kde a kdy se sestřih pre-mRNA uskutečňuje. Sestřih pre-mRNA byl studován většinou *in vitro* v bezbuněčných jaderných extraktech a byl považován za samostatný buněčný proces, který probíhá nezávisle na ostatních procesech v buněčném jádře. Bylo vyvinuto značné úsilí nalézt v buňce specifické kompartmenty, kde sestřih pre-mRNA může probíhat, ale v žádném z takovýchto kompartmentů se nepodařilo prokázat, že zde probíhá většina sestřihu pre-mRNA (Cmarko et al., 1999).

Jedním z prvních důkazů, že sestřih pre-mRNA se odehrává kotranskripčně, tedy v době, kdy RNA pol II stále ještě přepisuje gen do pre-mRNA, byly snímky z elektronového mikroskopu, zachycující transkripci choriových genů u *Drosophily*. Na těchto snímcích bylo zobrazeno, že nascentní pre-mRNA je ještě v průběhu transkripce zkrácena. Bylo tak dokázáno, že spliceosom s pre-mRNA asociuje v průběhu transkripce (viz Obrázek č. 1.7) (Beyer and Osheim, 1988).



**Obrázek č. 1.7 Detekce kotranskripčního sestřihu pre-mRNA**

(A) Snímek z elektronového mikroskopu zobrazující transkripci choriových genů u *Drosophily*.

(B) Schématické znázornění snímku z elektronového mikroskopu. Tyto symboly zobrazují: (-----) templátovou DNA, (\_\_\_\_) pre-mRNA, (●) částice snRNP, (x) předpokládané místo rozbití transkriptu

(C) Mapa vzniklých transkriptů. Na vertikální ose y umístění transkriptů odpovídá jejich pozici na templátové DNA. 5'konec transkriptů se nachází vlevo, 3'konec transkriptů je spojen s čárkovanou úhlopříčkou. Ta reprezentuje vzdálenost, kterou RNA pol II urazila na templátové DNA od začátku transkripce (respektive řečeno čas, který uběhl od začátku transkripce). Na transkriptu č. 27 lze pozorovat, že již došlo k sestřihu pre-mRNA a transkript byl zbaven intronu. Upraveno z Beyer and Osheim, 1988.

Toto prvotní pozorování kotranskripčního sestřihu pre-mRNA bylo potvrzeno pomocí chromatinových imunoprecipitací (Görnemann et al., 2005). Další experimenty, které měřily kinetiku a rychlost asociace částic snRNP s pre-mRNA zjistily, že sestřih pre-mRNA je dokončen v řádu desítek sekund, což taktéž potvrzuje existenci kotranskripčního sestřihu pre-mRNA (Huranová et al., 2010). Další studie dokázala použitím protilátky rozpoznávající fosforylovaný protein SF3b155 (P-SF3b155), který se nachází pouze v katalyticky aktivních spliceosomech a následnou kvantifikací signálu pro tento protein v chromatinu a nukleoplasmě, že až 80 % sestřihu pre-mRNA se odehrává kotranskripčně a že post-transkripční sestřih pre-mRNA se odehrává v jaderných útvech zvaných nuclear speckles (Girard et al., 2012).

Pokud se většina sestřihu pre-mRNA odehrává kotranskripčně, tak doba, kterou spliceosom má na vystřížení intronu, odpovídá času, který RNA pol II potřebuje na přepsání genu k poslednímu 3'SS a polyA místu. V kvasinkách by se však, dle této hypotézy, odehrávala většina sestřihu post-transkripčně, protože na základě průměrné rychlosti RNA pol II a průměrné délky kvasinkových genů, by většinou RNA pol II stihla gen přepsat, než by byl dokončen sestřih pre-mRNA. Celogenomová studie nascentních kvasinkových RNA však dokázala opak. RNA pol II je totiž schopná se na terminálním exonu zastavit a poskytnout tak dostatek času, aby sestřih pre-mRNA mohl proběhnout kotranskripčně (Carrillo Oesterreich et al., 2010). Schopnost zastavit se na terminálním exonu byla detekována i v lidských buňkách (Ameur et al., 2011). Kotranskripční sestřih se nachází mezi nejrůznějšími organizmy. Důvod, proč kotranskripční sestřih vznikl, není ale doposud řádně vysvětlen.

## 1.4 Alternativní sestřih

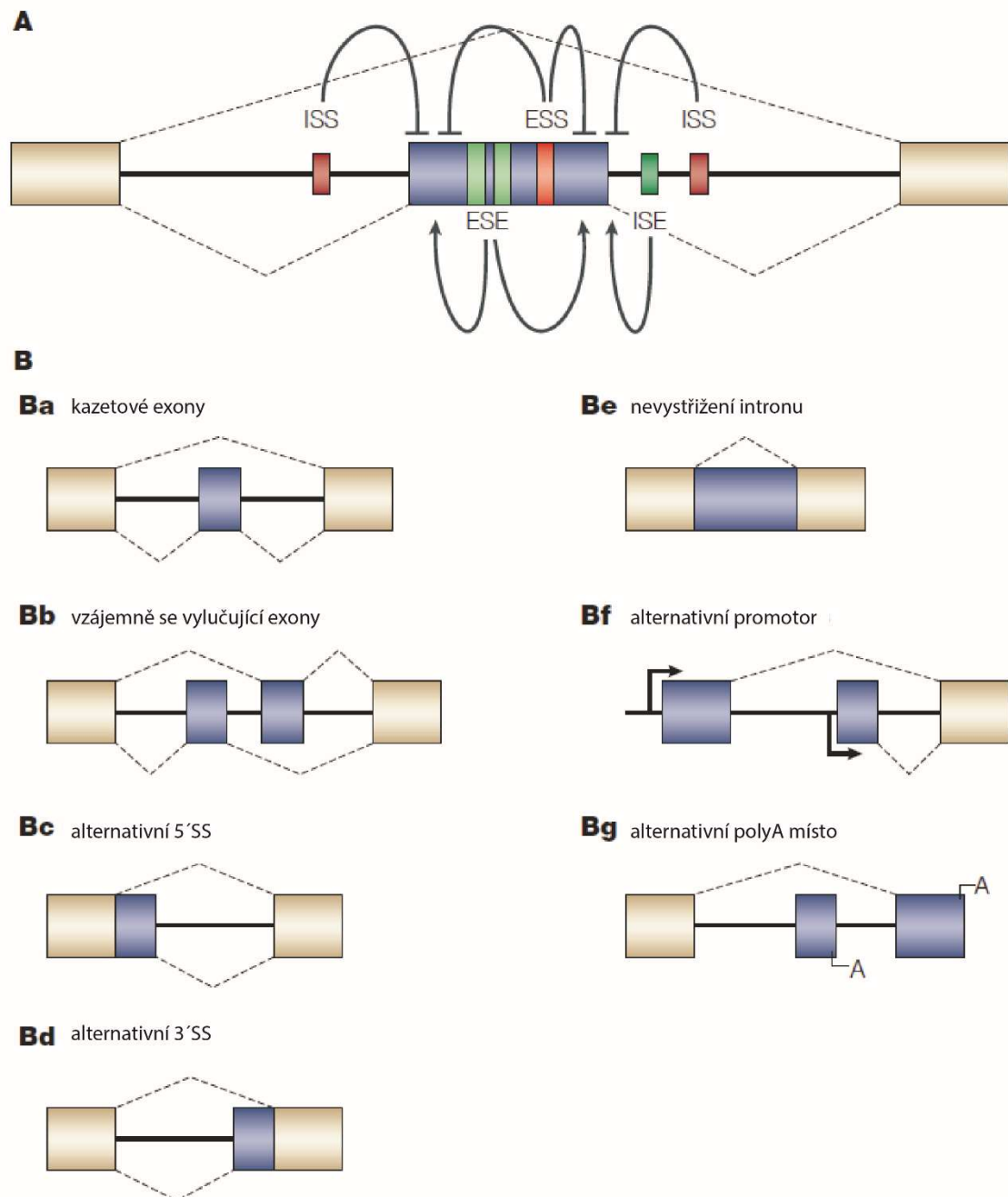
Již při objevu sestřihu pre-mRNA bylo pozorováno, že některé exony jsou ve výsledné mRNA zahrnuty vždy (tzv. konstitutivní exony) a některé pouze v určitých případech (tzv. alternativní exony). Tím byl ve své podstatě objeven alternativní sestřih a to, že z jedné pre-mRNA může vznikat více izoform mRNA (Chow et al., 1977).

Alternativní sestřih je elegantní mechanismus, jak buňka může výrazně zvýšit svoji proteinovou komplexitu. Je velmi rozšířený mezi vyššími eukaryoty a u člověka bylo ukázáno, že až 95 % všech lidských genů se účastní alternativního sestřihu (Barash et al., 2010). V kapitole 1.2 byly popsány konzervované sekvence pro sestřihová místa, které jsou rozpoznávány faktory podílejícími se na sestřihu pre-mRNA. Tato sestřihová místa se dělí na tzv. silná a slabá. Silná sestřihová místa jsou více podobná konzervovaným sekvencím a jsou lépe při sestřihu pre-mRNA rozpoznávána než slabá sestřihová místa. Alternativní sestřih je tak kompeticí o rozpoznání mezi slabými a silnými sestřihovými místy.

Alternativní sestřih je tvořen sedmi základními mechanismy, jak může být sestřižena pre-mRNA. Výsledná izoforma mRNA je výsledkem jednoho či kombinace těchto mechanismů. Základní mechanismy alternativního sestřihu jsou: kazetové exony, vzájemně se vylučující exony, alternativní 5'SS, alternativní 3'SS, nevystřižení intronu, alternativní promotor, alternativní polyA místo (viz Obrázek č. 1.8) (Matlin et al., 2005). V této práci je jako model pro studium alternativního sestřihu použit exon EDB genu *FNI*, tento alternativní exon je kazetový typ exonu a ve výsledné mRNA je zahrnut či vynechán (viz Obrázek č. 1.8 Ba).

Jelikož je alternativní sestřih tak rozšířeným mechanismem mezi různými živočišnými druhy a jeho poruchy vedou k závažným onemocněním, musí být velmi dobře kontrolován a regulován (Astrof et al., 2007; Chauhan et al., 2008). Jedněmi z regulátorů alternativního sestřihu jsou tzv. sestřihové enhancery a silencers. Sekvence, které jsou rozpoznávány těmito sestřihovými faktory jsou často velmi krátké a nachází se na mnoha místech pre-mRNA. Z tohoto důvodu nemohou pouze sestřihové faktory regulovat alternativní sestřih (Ankō et al., 2010). V dalších studiích bylo navrženo propojení mezi alternativním sestřihem, transkripcí, chromatinem a histonovými modifikacemi (Bieberstein et al., 2012; Carrillo Oesterreich et al., 2010). Regulace alternativního sestřihu má tedy mnoho úrovní a skládá se z mnoha interakcí, které ve výsledku rozhodují o

konečné izoformě mRNA. Dále v této kapitole budou diskutovány příklady jednotlivých typů regulací alternativního sestřihu.



**Obrázek č. 1.8 Základní mechanismy alternativního sestřihu a regulační elementy**

(A) Schématické zobrazení možných sekvencí v pre-mRNA pro sestřihové silencery či enhancery, které se mohou nacházet buď v sekvencích exonů (ESS či ESE) nebo intronů (ISS či ISE). Na tyto sekvence se váží sestřihové faktory, které pomáhají či blokují rozpoznání 5' a 3' SS.

(B) Schématické znázornění různých typů alternativního sestřihu (**Ba**) kasetové exony (**Bb**) vzájemně se vylučující exony (**Bc**) alternativní 5' SS (**Bd**) alternativní 3' SS (**Be**) nevystřížení intronu (**Bf**) alternativní promotor (**Bg**) alternativní polyA místo. Upraveno z Matlin et al., 2005.

### 1.4.1 Role SR a hnRNP proteinů v alternativním sestřihu

*Cis*-regulační sekvence jsou krátké regulační elementy, nacházející se v pre-mRNA (viz Obrázek č. 1.8 A). Podle pozice, kde se v pre-mRNA nacházejí, se dělí na: exonové sestřihové enhancery (ESE) či silencery (ESS) a intronové sestřihové enhancery (ISE) či silencery (ISS). SR a hnRNP proteiny jsou *trans*-aktivační faktory, které mohou asociovat s těmito *cis*-regulačními sekvencemi (Matlin et al., 2005).

SR proteiny většinou interagují se sekvencemi pro ESE a ISE. Na pre-mRNA se váží prostřednictvím RNA rozpoznávajícího motivu (RRM, z angl. RNA recognition motive). A díky své RS doméně jsou schopny usnadňovat skládání spliceosomu skrze protein-proteinové interakce. Protein SRSF5 například podporuje inkluzi exonu EDB do výsledné mRNA u genu *FNI* (Graveley and Maniatis, 1998; Lim and Sharp, 1998).

hnRNP proteiny (hnRNP, z angl. heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) jsou antagonisté SR proteinů. Interagují většinou se sekvencemi pro ESS a ISS. Na pre-mRNA se váží stejnou RRM doménou, dále ale obsahují sestřih inhibující doménu, která je bohatá na glycin. hnRNP proteiny fungují mnoha různými mechanizmy. Jedním z nich je blokování vazby částic snRNP na sestřihová místa či zablokování interakce mezi částicemi snRNP U1 a U2 (Sharma et al., 2005).

Obecně jsou SR proteiny považovány za sestřihové enhancery, které zvyšují inkluzi alternativních exonů do mRNA, zatímco hnRNP proteiny jsou brány jako sestřihové silencery, které naopak zvyšují vynechání alternativních exonů. Toto tvrzení však bylo vyvráceno pomocí iCLIP experimentů. U některých genů mohou SR proteiny, dle místa kam se na pre-mRNA váží, fungovat jako sestřihové enhancery i silencery (Ule et al., 2006). Obdobné pozorování bylo zjištěno i pro hnRNP proteiny. Tím pádem nejen typ *trans*-aktivačního faktoru, ale i pozice kam se na pre-mRNA váže, rozhoduje o výsledku alternativního sestřihu, což jen potvrzuje komplexnost a složitost tohoto procesu.

### 1.4.2 Alternativní sestřih a transkripce

Jak bylo zmíněno v kapitole 1.3, 80 % sestřihu pre-mRNA se odehrává kotranskripčně (Girard et al., 2012). Je tedy velmi důležité pochopit, jak transkripce může ovlivňovat alternativní sestřih. K tomuto pochopení byly navrženy dva modely: kinetický model (tzv. kinetic coupling model) a vazebný model (tzv. recruitment model, viz Obrázek č. 1.9). Vztah mezi transkripcí a alternativním sestřihem, jak dokazují četné výsledky, nelze popsat pouze jedním či druhým typem modelu, *in vivo* existují oba modely zároveň a

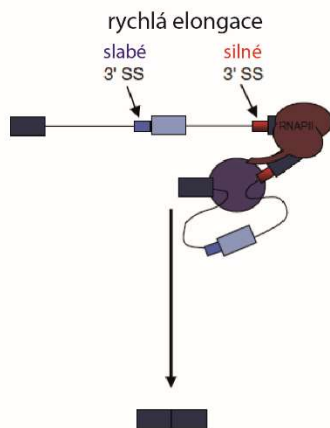
některé exony jsou vystříženy za pomoci jednoho či druhého typu regulace alternativního sestřihu.

Kinetický model je založen na rychlosti elongace RNA pol II. Alternativní sestřih je kompeticí mezi silnými a slabými sestřihovými místy. Jakmile se na nově syntetizované pre-mRNA tyto sekvence objeví, společně s regulačními sekvencemi jako jsou ESE, ISE či ESS, ISS, začne probíhat sestřih pre-mRNA. Sekvence, které ale způsobí pozastavení transkripce, chromatinové modifikace, které způsobují zkompaktnění chromatinu či faktory, které blokují činnost RNA pol II, snižují rychlost elongace RNA pol II (Carrillo Oesterreich et al., 2010; Schor et al., 2009). Tím poskytují spliceosomu více času na rozpoznání slabého sestřihového místa, předtím než dojde k syntéze silného sestřihového místa. Výsledkem je častější zahrnutí tohoto alternativního exonu do výsledné mRNA. V případě, kdy dochází ke zvýšení rychlosti elongace RNA pol II, je ale pozorován opačný efekt. Alternativní exon obklopený slabými sestřihovými místy je z výsledné mRNA častěji vynechán (viz Obrázek č. 1.9 A). Důkazem této regulace alternativního sestřihu byly experimenty používající mutantní variantu RNA pol II. Tato RNA pol II obsahuje substituci jedné aminokyseliny ve své podjednotce Rpb 1, což se projevuje nižší elongační rychlostí (Boireau et al., 2007). Pokud byla tato polymeráza použita k přepisu genu *FNI*, bylo zaznamenáno vyšší zahrnutí alternativního exonu EDA do výsledné mRNA (de la Mata et al., 2003). Toto pozorování je tak v souladu s tzv. kinetickým modelem.

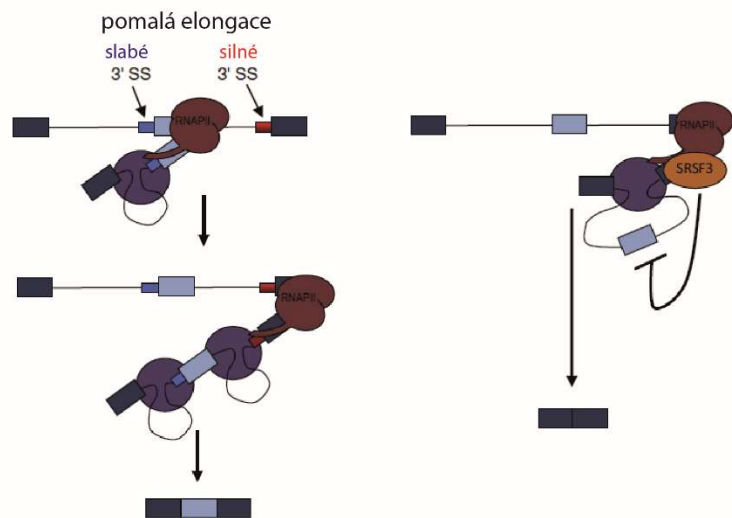
Další model jak transkripce může ovlivňovat alternativní sestřih je model vazebný. Tento model je založený na CTD RNA pol II. CDT může fungovat jako vazebné místo pro sestřihové faktory. Ty se s CTD dostávají do těsné blízkosti nově vznikající pre-mRNA a mohou ovlivnit alternativní sestřih. Příkladem je asociace SR proteinu SRSF3 s CTD. Tento faktor je zodpovědný za vynechání alternativního exonu EDA z výsledné pre-mRNA (viz Obrázek č. 1.9 B). Snížení množství tohoto proteinu se projeví vyšším zahrnutím exonu EDA do výsledné pre-mRNA. Při použití RNA pol II která nemá CTD, snížení množství proteinu SRSF3 nemá na alternativní sestřih žádný efekt. Z čehož vyplývá, že CTD je nezbytná pro vazbu proteinu SRSF3 (de la Mata and Kornblihtt, 2006). SR proteiny neinteragují se sestřihovými místy na pre-mRNA jen díky asociaci s RNA pol II, nezbytnou podmínkou je aktivní transkripce. Alternativní sestřih není ovlivňován pre-asociovanými komplexy SR proteinů a RNA pol II (Sapra et al., 2009).



A Kinetický model



B Vazebný model



### Obrázek č. 1.9 Vztah mezi transkripcí a alternativním sestřihem

(A) Alternativní sestřih může být ovlivněn rychlostí RNA pol II tzv. kinetický model. Na obrázku můžeme pozorovat alternativní exon, který má slabé 3'SS a za ním následuje konstitutivní exon se silným 3'SS. Při rychlé elongaci je doba mezi syntézou slabého 3'SS a silného 3'SS krátká. Sestřihové faktory mají kratší čas na rozpoznání slabého 3'SS místa, a proto je alternativní exon častěji vynechán z výsledné mRNA. Při pomalé elongaci je tomu naopak.

(B) Vazebný model je založen na tom, že sestřihové faktory mohou asociovat s transkripčními komponenty a ovlivnit tak alternativní sestřih. Příkladem může být sestřihový faktor SRSF3, který interaguje s CTD RNA pol II a inhibuje zahrnutí alternativního exonu do výsledné mRNA. Upraveno z Nieto Moreno et al., 2015.

### 1.4.3 Chromatin, histonové modifikace a alternativní sestřih

DNA má díky své fosfodiesterové vazbě záporný náboj a sama od sebe by se nebyla schopna složit do prostoru buněčného jádra. Tento problém řeší vysoce bazické proteiny zvané histony, které s DNA interagují, kompenzují její záporný náboj a umožňují její kompaktnější sbalení v chromatinu.

Za základní jednotku chromatinu je považován nukleozom. Nukleozom je tvořen z DNA a histonového jádra. Histonové jádro se skládá z proteinů H2A, H2B, H3 a H4, každý z těchto proteinů je v histonovém jádře přítomen dvakrát a vzniká tak histonový oktamer. Kolem tohoto oktameru je obtočena DNA. Průměrná délka obtočené DNA je 147 bp, což přibližně odpovídá průměrné délce savčího exonu (~123 bp) (Scherer S., 2009).

Sekvenováním DNA izolované z nukleozomů, bylo potvrzeno, že exony se častěji nachází na nukleozomech v porovnání s introny (Andersson et al., 2009). Dokonce bylo zjištěno, že exony, které jsou obklopeny dlouhými introny, či slabými sestřihovými místy se vyskytují na nukleozomech častěji, než exony obklopené krátkými introny či silnými sestřihovými místy. S nukleozomy také ve vyšší míře interagují alternativní exony,

zatímco pseudoexony se na nukleozomech nenachází (Tilgner et al., 2009). Pozice nukleozomů tedy napomáhá identifikaci exonů a může sloužit k lepšímu rozpoznání slabých sestřihových míst.

Jádro nukleozomu je tvořeno oktamerem histonových proteinů. Tyto proteiny mají velmi dlouhé N- konce, které vyčnívají ven z globulární struktury oktameru a mohou být modifikovány nejrůznějšími typy posttranslačních modifikací. V současnosti histonové modifikace dělíme do osmi kategorií: acetylace, metylace, fosforylace, ubiquitynilace, sumoylace, ADP ribosylace, deiminace, izomerace prolinu (Hnilicová and Staněk, 2011). Největší vliv na alternativní sestřih z těchto modifikací mají acetylace a metylace, a proto budou v této práci více popsány.

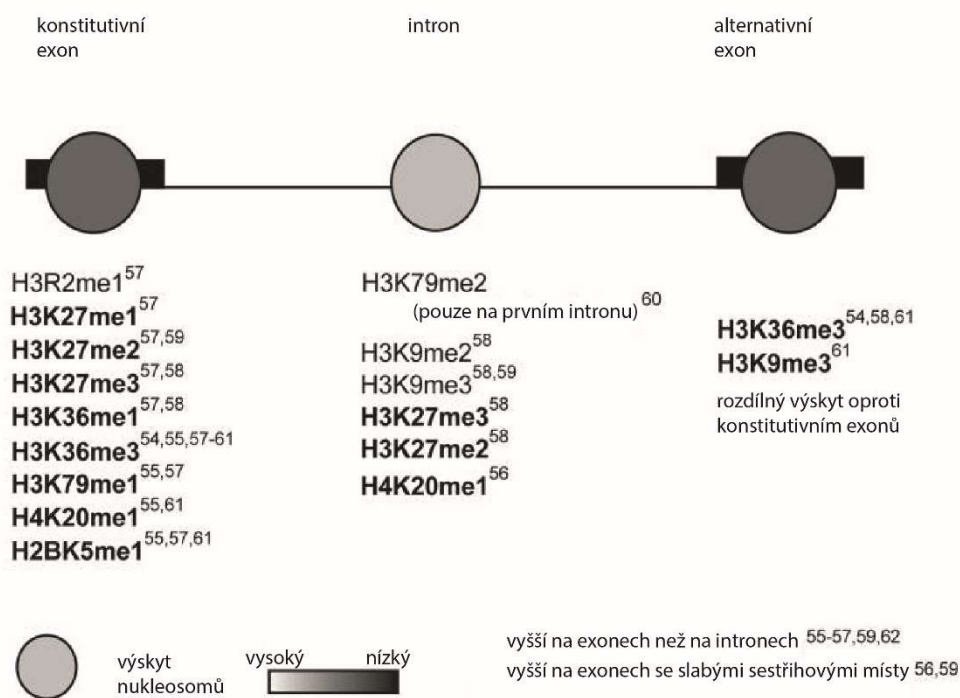
Histonové modifikace mohou alternativní sestřih či obecně sestřih pre-mRNA ovlivňovat dvěma způsoby. První způsob je založen na tom, že histonové modifikace ovlivňují strukturu chromatinu. Tím je pozitivně či negativně ovlivněna elongační rychlost RNA pol II a alternativní sestřih je regulován kinetickým modelem. Druhý způsob je založen na tom, že histonové modifikace mohou asociovat se sestřihovými aktivátory či represory a tyto proteiny způsobí rozpoznání či vynechání alternativních exonů (Bannister and Kouzarides, 2011).

Acetylace je nejvíce dynamickou histonovou modifikací, doba existence této modifikace se počítá v řádu minut (Barth and Imhof, 2010). Acetylace probíhá na lysinu histonů 3 a 4 a přináší do chromatinového prostředí záporný náboj, ruší tak schopnost bazických histonů odstiňovat repulzní síly fosfátových skupin DNA. Po acylaci histonů dochází k rozvolnění chromatinové struktury. Alternativní sestřih je pomocí acetylace ovlivňován zejména prvním způsobem, tedy změnou struktury chromatinu a rychlosti elongace RNA pol II.

Typickým příkladem tohoto mechanismu je alternativní sestřih exonu 18 genu *NCAM* (neural cell adhesion molecule). Při šíření nervového vzruchu dochází k depolarizaci membrány, ta způsobí hyperacetylaci H3K9 v oblastech obklopujících alternativní exon 18, rychlost elongace RNA pol II se v těchto oblastech zvýší, což zapříčiní častější vynechání exonu ve výsledné mRNA pro gen *NCAM* (Schor et al., 2009). Při inhibici histonových deacetyláz (HDAC) a vzniklé hyperacetylaci histonů byl nejvíce ovlivněn alternativní sestřih genů pro rozličné iontové kanály, regulátory buněčného cyklu a apoptózy. Acetylace je histonovou modifikací, která mění alternativní sestřih u genů, které musí rychle reagovat na změnu podmínek (Hnilicová et al., 2011).

Metylace histonů je oproti acetylaci považována za stabilní histonovou modifikaci. Histony mohou být metylovány na lysinu, kde dochází ke, mono-, di- či tri-metylaci, nebo na argininu, kde dochází k di-metylaci. Metylová skupina po navázání na lysin či arginin nemění celkový náboj proteinu, tudíž nedochází k žádným změnám mezi vazbou DNA s histony. Regulace alternativního sestřihu pomocí metylace histonů je zejména ve vazbě sestřihových regulátorů.

Některé metylace histonů se vyskytují v určitých oblastech genů (viz Obrázek č. 1.10). Vysoký výskyt těchto histonových modifikací poté koreluje s mírou zahrnutí alternativních exonů do výsledné mRNA. Například H3K36me3, H3K79me1, H2BK5me1 a HK27me1 jsou asociovány s exony, které jsou často zahrnuty do výsledné mRNA. Zatímco H3K27me2/3 a H3K36me1 jsou asociovány s častěji vynechávanými exony. Histonové modifikace H3K36me3 a H3K27me1 jsou považovány za modifikace, které jsou spjaté s aktivní transkripcí. Naopak histonové modifikace H3K27me3 a H3K36me1 jsou často asociovány s kompaktní strukturou chromatinu a jejich výskyt značí nízkou úroveň transkripce.



**Obrázek č. 1.10 Schématické znázornění histonových modifikací asociovaných s určitými oblastmi genu.** Upraveno z Hnilicová and Staněk, 2011.

Jak již bylo zmíněno, metylace ovlivňuje alternativní sestřih prostřednictvím vazby sestřihových regulátorů. Příkladem může být histonová modifikace H3K4me3, ta se nachází v blízkosti TSS u aktivně přepisovaných genů a její množství koreluje

s transkripční aktivitou genu (Barski et al., 2007). Zároveň je závislá i na funkčním sestřihu pre-mRNA. Pokud byl sestřih pre-mRNA zablokován inhibitory, došlo ke ztrátě H3K4me3 (Bieberstein et al., 2012). Propojení této histonové modifikace se sestřihem pre-mRNA je skrze vazbu chromodoménového proteinu CHD1, který je schopen vázat částici snRNP U2 (Sims et al., 2007). Dalším příkladem může být interakce mezi H3K9me3 a transkripčním represorem HP1 $\gamma$ . Odstranění tohoto transkripčního represoru, mělo za následek rychlejší elongaci RNA pol II v blízkosti alternativního exonu genu *CD44* a nižší účinnost sestřihu pre-mRNA. H3K9me3 a HP1 $\gamma$  jsou schopny ovlivňovat alternativní sestřih rozdíly v elongaci RNA pol II (Saint-André et al., 2011).

#### 1.4.4 Regulační elementy DNA a jejich vliv na elternativní sestřih

Z výše uvedených dat je patrné, že existuje silné propojení mezi transkripcí, chromatinovými modifikacemi, pozicí nukleozomu a alternativním sestřihem. Otázkou ale zůstává, zdali alternativní sestřih může být ovlivněn i jinými sekvencemi DNA než těmi, které reprezentují ESE, ISE, ESS a ISS či různě silná 3' a 5' SS.

Experimenty prokázaly, že steroidní hormony mohou ovlivnit alternativní sestřih, ovšem pouze v případech, kdy se gen nachází pod kontrolou na steroidy-senzitivního promotoru (Auboeuf et al., 2002). Tyto výsledky naznačují, že alternativní sestřih může být ovlivněn faktory, které asociují se specifickými sekvencemi přítomnými v promotorových oblastech.

Příkladem může být histonová acetyláza p300. Ta asociuje s CRE vazebnými sekvencemi nacházejícími se v promotoru skrze transkripční faktor CREB. V naší laboratoři byly připraveny reportérové systémy obsahující promotor s CRE vazebnými místy a minigen pro *FNI* s alternativním exonem EDB. Snížení množství histonové acetylázy p300 pomocí siRNA mělo za následek větší zahrnutí exonu EDB do výsledné mRNA. Stejný efekt byl pozorován i v případě delecí či mutací CRE vazebných míst v oblasti promotoru. Histonová acetyláza p300 zajišťuje acetylaci H4 v oblasti genu *FNI*. Snížení množství acetylázy p300 či delecí/mutací CRE vazebných míst dochází ke snížení acetylace histonu H4 na reportérovém minigenu. Tato data naznačují, že acetylace histonů může být jedním z mechanismů, jak specifické vazebné sekvence v promotoru ovlivňují alternativní sestřih (Dušková et al., 2014).

Další studie ukázala, že kromě promotorových oblastí může alternativní sestřih být ovlivněn i transkripčními enhancery. Byl použit reportérový systém obsahující minigen

*FNI* s alternativním exonem EDA a tento systém byl pod kontrolou  $\alpha$ -globinového promotoru. Vložením transkripčního enhanceru SV40 před popsany minigen došlo ke snížení zahrnutí exonu EDA do výsledné mRNA. Postupnými delecemi částí transkripčního enhanceru, byl objeven tzv. minimální enhancer, který se skládá z dvou 72 bp dlouhých repetit. Tyto repetice se ukázaly být schopné regulovat rychlost RNA pol II. Tak bylo navrženo, že alternativní sestřih je regulován transkripčními enhancery skrze kinetický model (Kadener et al., 2002).

## 1.5 Fibronektin (*FNI*) – modelový gen pro studium alternativního sestřihu pre-mRNA

Fibronektin (*FNI*) je velký glykoprotein o přibližné velikosti 500 kDa. Skládá se ze dvou téměř identických podjednotek o velikosti 230-250 kDa. Tyto podjednotky spolu vytvářejí dimer, pomocí disulfidických můstků, které se nacházejí v oblasti C-konců těchto podjednotek. Každá podjednotka se skládá ze tří částí, které obsahují opakující se subpodjednotky členěné na typy I, II a III. Subpodjednotky jsou tvořeny 40-90 aminokyselinami, délka závisí na typu subpodjednotky. Všechny tyto typy subpodjednotek se nacházejí i u jiných genů, což podporuje teorii, že 75 kbp dlouhý gen *FNI* vznikl přesouváním a kopírováním již existujících exonů v průběhu evoluce (Engel et al., 1991).

*FNI* je jednou z hlavních složek extracelulární matrix (ECM) tkání. Interaguje s integriny a transmembránovými proteiny. Tyto interakce propojují extracelulární matrix s aktinovým cytoskeletem a z těchto důvodů je *FNI* důležitý při buněčné adhezi, migraci a diferenciaci buněk, embryogenezi či hojení ran (Grinnell et al., 1981). V lidském těle můžeme detekovat dva typy fibronektinu. Buněčný typ fibronektinu je exprimován lokálně a nachází se na povrchu buněk. Plazmatický typ fibronektinu se tvoří v játrech a je jedním z hlavních proteinů nacházejících se v krevní plasmě (300 µg/ml), účastní se procesů srážení krve a je schopný se vázat na široké spektrum povrchových receptorů. Nesprávná exprese fibronektinu či nadměrná produkce jedné z jeho izoform vede k závažným onemocněním a patologiím (Williams et al., 2008). Delece genu *FNI* se u myši ukázala být letální (George et al., 1993).

Gen *FNI* má několik alternativně sestřihovaných exonů a byl jedním z prvních genů, u kterých byl alternativní sestřih zaznamenán (Kornblihtt et al., 1984; White and Muro, 2011). V genu *FNI* se nalézají celkem tři oblasti podstupující alternativní sestřih. Jedná se o dva exony, které kódují subpodjednotky typu III. Tyto exony jsou označovány jako exon EDA a EDB (či také jako ED-A a ED-B nebo také jako EIIIA a EIIB). Je to kazetový typ exonů a ve výsledné mRNA jsou buď zahrnuty či vynechány. Třetí oblastí podstupující alternativní sestřih je nehomologní oblast označovaná IIICS nacházející se blízko konce genu *FNI*. Tato oblast může dát vzniknout 5ti rozdílným izoformám mRNA. U člověka se tak díky alternativnímu sestřihu pre-mRNA může vyskytovat až 20 izoform mRNA pro fibronektin (Ffrench-Constant et al., 1995). Ačkoliv je známo málo o regulaci alternativního sestřihu IIICS oblasti, exony EDA a EDB jsou extenzivně studovány. A

slouží jako modelové exony pro studium mechanismu a regulace alternativního sestřihu (Dušková et al., 2014; Hnilicová et al., 2011; Kadener et al., 2002).

Aberantní alternativní sestřih exonů EDA a EDB způsobuje řadu nemocí a patologií. U myší, u kterých byl exon EDA konstitutivně přítomný ve všech mRNA kódujících fibronektin, byla vysoká pravděpodobnost vzniku trombózy (Chauhan et al., 2008). Cévy, jejichž extracelulární typ fibronektinu obsahuje vyšší hladiny exonů EDA a EDB, měly větší pravděpodobnost ke vzniku arterosklerózy. Kromě toho jsou varianty fibronektinu obsahující vysokou hladinu exonu EDA či EDB často detekovány v cévách obklopujících nádory. A z tohoto důvodu jsou tyto varianty dokonce nazývány jako onkofetální fibronektinové izoformy (Magnusson and Mosher, 1998). Patologie lze pozorovat i v případě, kdy exon EDA či EDB ve výsledné mRNA chybí. Delece obou exonů EDA i EDB se u myší ukázala být embryonálně letální (Astrof et al., 2007). Delece pouze exonu EDA se projevila netypickým hojením ran na kůži. Zatímco delece exonu EDB u myší nevykázala žádný abnormální vývoj (White and Muro, 2011).

Alternativní sestřih exonu EDA je regulován pomocí SR proteinů SRSF1 a SRSF7. Tyto SR proteiny se váží na sekvenci exonového sestřihového enhanceru, která se v exonu EDA vyskytuje. Interakce mezi exonem EDA a SR proteiny způsobuje lepší rozpoznání exonu EDA a jeho častější zahrnutí do výsledné mRNA (Cramer et al., 1999). Inkluze exonu EDA je také regulována dráhou pro PI 3-kinázu a dráhou mTOR, ty jsou schopné ovlivnit fosforylaci SRSF1 a tím inkluzi exonu EDA (White et al., 2010). Další SR protein, který ale způsobuje vynechání exonu EDA z výsledné mRNA, je protein SRSF3. SRSF3 působí pouze v případě, kdy je gen *FNI* přepisován RNA pol II s kompletní CTD. Tento typ regulace je tedy spjat s transkripcí (Dušková et al., 2014).

Alternativní sestřih exonu EDB je regulován pomocí SR proteinů SRSF5. SRSF5 zvyšuje inkluzi exonu EDB do výsledné mRNA (Lim and Sharp, 1998). Negativním regulátorem, který naopak způsobuje vynechání exonu EDB z mRNA, je protein PTB (z angl. polypyrimidine tract-binding protein) (Norton and Hynes, 1993). Za použití reportérových minigenů bylo dokázáno, že inkluze exonu EDB může být ovlivněna také typem promotoru a asociací promotoru s proteinem CREB (Dušková et al., 2014). Další práce ukázala že, zahrnutí či vynechání exonu EDB je také závislé na chromatinových modifikacích a procesivitě RNA pol II (Hnilicová et al., 2011). Alternativní sestřih exonu EDB je tak kromě SR a hnRNP proteinů regulován také kinetickým modelem (viz kapitola 1.4).

## 1.6 CRISPR/Cas9 – historie a mechanismus

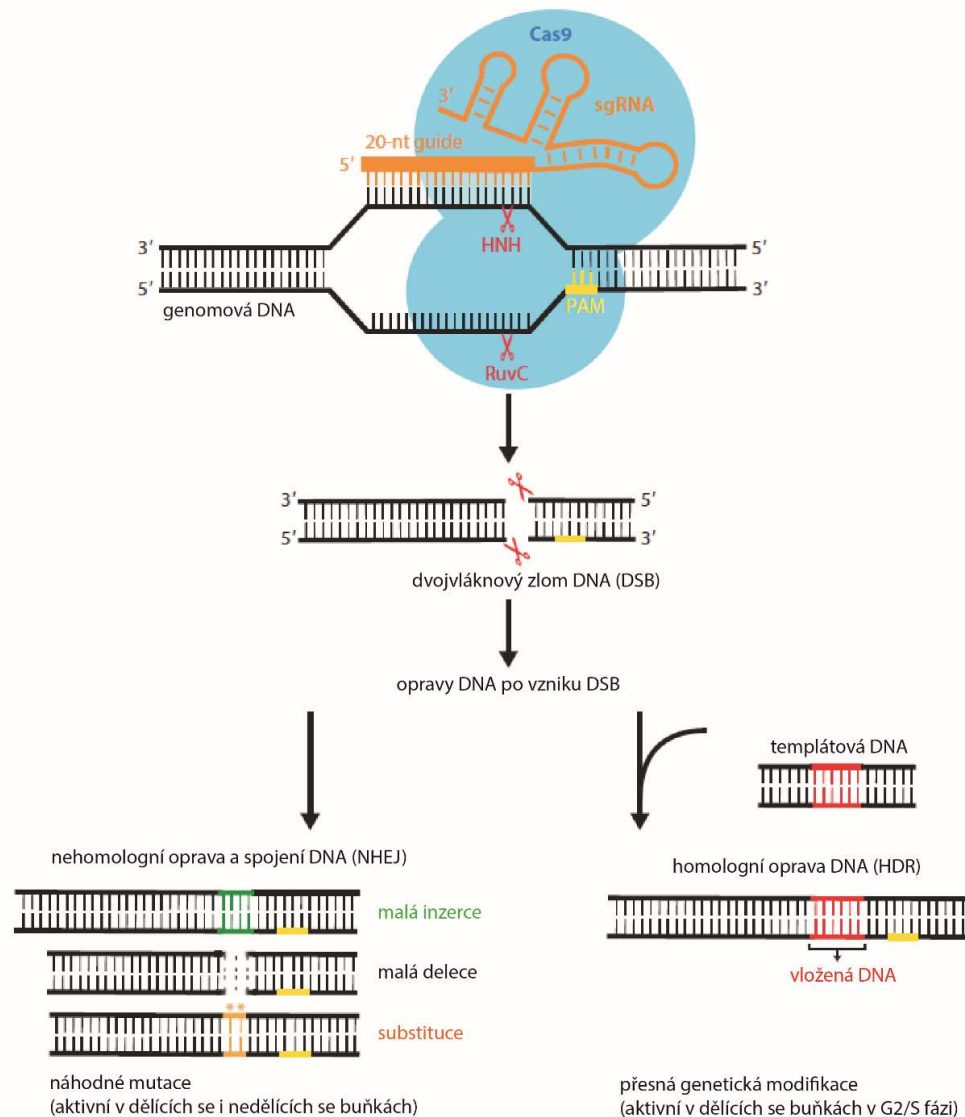
Systém CRISPR/Cas9 je zkratkou pro clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) a CRISPR-associated protein 9 (Cas9). Systém CRISPR/Cas9 byl poprvé objeven jako mechanismus adaptivní imunity v bakteriích a archeích, kde slouží jako obrana proti fágové infekci a přenosům plazmidů v přírodě (Jinek et al., 2012). Výsledkem tohoto obranného mechanismu jsou dvojvláknové zlomy v invazivní DNA (z angl. double strand breaks, DSB). K rozpoznání cílové sekvence systém vyžaduje, aby cílová sekvence obsahovala tzv. PAM motiv (z angl. protospacer adjacent motif). Celý obranný mechanismus je pak založen na párování mezi gRNA (z angl. guide RNA) a cílovou sekvencí DNA, která obsahuje PAM motiv. Dochází ke vzniku duplexu RNA-DNA, za pomoci interakcí mezi proteinem Cas9 a DNA, což vede ke konformačním změnám a tvorbě DSB.

Systém CRISPR/Cas9 nevyžaduje tvorbu specifického proteinu pro každou cílovou sekvenci, jak tomu bylo u systémů TALEN (transcription activator-like effector nucleases) a zinc-finger nukleás. Endonukleáza Cas9 je k cílové sekvenci dovedena jen na základě párování mezi RNA-DNA. Tato jednoduchost udělala ze systému CRISPR/Cas9 revoluční metodu pro genové inženýrství a byla již využita v řadě různých typů buněk a organizmů (Ma Yuanwu et al., 2014).

Pro genové inženýrství se využívá typ II systému CRISPR/Cas9. Tento systém funguje na základě interakce mezi CRISPR RNA (crRNA) a *trans*-aktivační crRNA (tracrRNA). Tyto RNA společně vytvářejí duplex crRNA-tracrRNA, ten může být nahrazen vytvořenou RNA zvanou single guide RNA (sgRNA). sgRNA je schopná navést endonukleázu Cas9 ze *Streptococcus pyogenes* (SpyCas9) nad cílovou sekvencí. Ta se označuje jako RGEN, je obvykle dlouhá 20 bp a za ní musí bezpodmínečně následovat PAM motiv (nejčastěji se jedná o sekvenci NGG). Párováním mezi sgRNA a sekvencí RGEN se vytváří duplex RNA-DNA tzv. R-loop. Endonukleáza Cas9 obsahuje dvě domény s nukleázovou aktivitou. Doména HNH štěpí na vlákně DNA, které bylo komplementární ke sgRNA. Doména RuvC štěpí na opačném vlákně DNA, tzv. na nekomplementárním vlákně. DSB je těmito doménami vytvořen zpravidla 3 bp proti směru transkripce od PAM motivu. DSB jsou opravovány reparačními mechanismy hostitelské buňky. V přítomnosti homologního templátu je DSB opraven za pomoci homologní rekombinace (HDR, z angl. homology direct repair). Tento opravný mechanismus



umožňuje vnést do genomu hostitelské buňky přesnou sekvenci, kterou požadujeme. Bez přítomnosti homologního templátu jsou DSB opraveny pomocí mechanismu nehomologního spojení (z angl. non-homologous and joining, NHEJ). Výsledkem tohoto opravného mechanismu vznikají v cílové sekvenci malé inserce či delece, které naruší její správnou expresi (viz Obrázek č. 1.8) (Jiang and Doudna, 2017).



**Obrázek č. 1.11 Mechanismus editace genomu pomocí CRISPR/Cas9 systému**

Navrhnutá sgRNA navede endonukleázu Cas9 k předem určenému místu v genomu. K tomuto procesu dochází díky párování mezi 20 nt dlouhou gRNA (obsaženou v sgRNA) a sekvencí DNA určeného místa. Párování se projeví konformačními změnami v endonukleáze Cas9, která se stává katalyticky aktivní a způsobí DSB. Ten vzniká 3 nt proti směru transkripce od PAM sekvence. PAM sekvence je na obrázku označena jako krátká žlutá čára. DSB je opraven pomocí DNA reparačních mechanismů hostitelské buňky. Bez přítomnosti homologního templátu jsou nejčastější opravy mechanismem NHEJ. Mechanismus NHEJ způsobuje v cílové sekvenci náhodné krátké delece, inserce či substituce. Pokud je v buňce přítomný homologní templát, může být DSB opraven mechanismem HDR. Při tomto typu opravného mechanismu může být do cílové sekvence buňky vložena přesně požadovaná sekvence. Upraveno z Jiang and Doudna, 2017.

## 2. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda vzdálené transkripční regulační elementy mohou mít vliv na alternativní sestřih pre-mRNA *in vivo*. V práci byla predikována sekvence pro transkripční enhancer fibronektinového genu. Po delecii této sekvence bylo sledováno, jak bude ovlivněn alternativní sestřih exonu EDB tohoto genu.

- Pomocí bioinformatické analýzy identifikovat transkripční enhancer pro gen fibronektinu.
- Odstranit identifikovaný enhancer z genomu HeLa buněk.
- Charakterizovat vliv odstraněného enhanceru na transkripci fibronektinového genu.
- Zjistit, jestli odstraněný enhancer ovlivňuje alternativní sestřih fibronektinové pre-mRNA.

### 3. MATERIÁL

#### 3.1 Použité chemikálie

2x SYBR Master Mix	Roche, CHF
agaróza	Sigma-Aldrich, USA
Ambion <sup>R</sup> Nuclease-Free Water	ThermoFisher scientific, USA
antibiotika: Ampicilin trihydrát VENETRAL <sup>TM</sup>	Sigma-Aldrich, USA
Blasticidin (10 mg/ml)	ThermoFisher scientific, USA
Kanamycin sulfát	Sigma-Aldrich, USA
Bovine Serum Albumin (BSA, ≥95%)	Sigma-Aldrich, USA
betaine (≥98%, perchloric acid titration)	Sigma-Aldrich, USA
chloroform (CHCl <sub>3</sub> )	Fisher scientific, USA
dATP (100 mM)	ThermoFisher scientific, USA
dCTP (100 mM)	ThermoFisher scientific, USA
dGTP (100 mM)	ThermoFisher scientific, USA
dTTP (100 mM)	ThermoFisher scientific, USA
dimetylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
DNA Clean & Concentrator <sup>TM</sup>	Zymo research, USA
Dobbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich, USA
ethanol absolutní	Meck, SNR
fetální bovinní sérum (FBS)	Biochron, USA
Filter ReliaPrep <sup>TM</sup> 0,2 μm	Ahlstrom, SRN
GelStar <sup>TM</sup> , Nucleic Acid Gel Stain 10 000x	Lonza, CHF
GeneRuler <sup>TM</sup> 100 bp Plus DNA Ladder	ThermoFisher scientific, USA
GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb DNA Ladder	ThermoFisher scientific, USA
glycin	Sigma-Aldrich, USA
glykogen (5 mg/ml)	Invitrogen, USA
kyselina boritá	Sigma-Aldrich, USA
kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Lipofectamin LTX	ThermoFisher scientific, USA
Loading dey 6x	ThermoFisher scientific, USA
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	ThermoFisher scientific, USA

octan amonný (CH <sub>3</sub> COO NH <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, USA
octan sodný (CH <sub>3</sub> COONa)	Sigma-Aldrich, USA
Opti-MEM™ (bez fenolové červeně)	ThermoFisher scientific, USA
Penicilin Streptomycin (Pen Strep, 5 000 U/ml)	ThermoFisher scientific, USA
fenol:chloroform:isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma-Aldrich, USA
PLUS™ Reagent	ThermoFisher scientific, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, USA
QIAquick PCR purification Kit	QIAGEN, USA
Trisma base	Sigma-Aldrich, USA
TRIzol™ Reagent	ThermoFisher scientific, USA
Trypsin-EDTA roztok (0,5 % trypsin, 0,2 % EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Zymoclean™ Gel DNA Recovery	Zymo Research, USA

### 3.2 Použité enzymy

Phusion polymeráza (2 U/μl)	ThermoFisher scientific, USA
T4 polynukleotid kináza (PKN, 5 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA
proteináza K, rekombinantní, PCR Grade	Sigma Aldrich, USA
<u>restrikční endonukleázy:</u>	
AleI HF (10 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA
ApaI (50 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA
BamHI HF (20 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA
BbsI (10 U/μl)	ThermoFisher scientific, USA
EcoRI HF (20 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA
EcoRV HF (20 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA
HindIII HF (20 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA
KpnI - HF (20 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA
PvuI - HF (20 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA
SacII - HF (20 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA
XbaI (20 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA
Taq polymeráza (5 U/μl)	ThermoFisher scientific, USA
T4 DNA ligáza (400 U/μl)	New England BioLabs (NEB), USA

### 3.3 Pufry a média

1x TBE pufr (Tris-borát-EDTA pufr):

89 mM Trizma base; 2 mM EDTA; 89 mM kyselina boritá; pH 8,3

1xPBS pufr (fosfátový pufr s chloridem sodným):

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

1xTE pufr (Tris-EDTA pufr):

10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0

LB médium (Luria-Bertani médium):

1% (w/v) tryptofan, 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt, 1% NaCl, pH 7,0

SOC médium:

0,2% (w/v) tryptofan, 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt, 1mM NaCl, 0,25 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM glukóza, pH 7,0

Zamrazovací médium pro tkáňové kultury:

10% (v/v) DMSO, 1% (v/v) Pen Strep, 89% (v/v) DMEM médium

1x G+ pufr (ThermoFisher scientific, USA):

10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,5 při 37 °C

1x Cutsmart pufr (NEB, USA):

50 mM octan draselný, 20 mM Tris-acetát, 10 mM octan hořečnatý, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,9 při 25 °C

1x T4 DNA ligásový pufr (NEB, USA):

50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7,5 při 25 °C

1x NEB4 pufr (NEB, USA):

20 mM Tris-acetát, 10 mM octan hořečnatý, 50 mM octan draselný, 1 mM DTT, pH 7,9 při 25 °C

10x Taq pufr s KCl (ThermoFisher scientific, USA):

100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0,8% (v/v) Nonidet P40, pH 8,8 při 25 °C

5x Phusion pufr pro GC bohaté tépláty (ThermoFisher scientific, USA)

### 3.4 Buněčné kultury

bakterie: kompetentní bakterie *E.coli*, kmen *DH5α*

lidské tkáňové kultury: HeLa WT, HeLa KO 1,2,3 – KO linie s vydeletovanou sekvencí pro predikovaný transkripční enhancer pro gen *FNI*-(připraveny v této práci)

### 3.5 Seznam použitých oligonukleotidů

název oligo-nukleotidů	sekvence [5'-3']	použití	
hFN1e1 5'G2 pX330	F : :	CACCGTGAAGGTTAGTGATATGGTT	klonování 5'gRNA
	R : :	AAACAACCATATCACTAACCTTCAC	
hFN1e1 3'G1 pH1	F : :	TCCCATGTGACTTTAGTTGCTTAAT	klonování 3'gRNA
	R : :	AAACATTAAGCAACTAAAGTCACAT	
hFN1e1 5'boundary pAVR	F : :	GGATCCCAGCCAAACCATATCACTA- ACCTTCAATGCGAT	klonování 5' vazebného místa pro 5' gRNA
	R : :	CGCATTGAAGGTTAGTGATATGGTT- TGGCTGGGATCC	
hFN1e1 3'boundary pAVR	F : :	GGATCCCAACCCATTAAGCAACTAA- AGTCACATCCCGAT	klonování 3' vazebného místa pro 3'gRNA
	R : :	CGGGATGTGACTTTAGTTGCTTAAT- GGGTTGGGATCC	
hFN1e G1-3' XbaI	F : :	GGTTCTAGACTTTTTTTAAACGCTGACGT CATCAACCC	klonování 3'gRNA do plazmidu pX330-5'-gRNA
hFN1e G1-3' KpnI	R : :	AAGGGTACCAAAGCTGGAGCTCCACC GC	
hFN1 LA BamHI	F : :	GAACAGGATCCATTTTTAAATAACAC	klonování
hFN1 LA EcoRI	R : :	CTTATGGAATTCTCATCTCAAATTATA ATC	
hFN1 RA EcoRI	F : :	ATCCGAATTCATTTTCAAATTTTGT	klonování
hFN1 RA HindIII.	R : :	ACATATCAAGCTTCTGGACTTCTAAGT TA	
hFN1 PCR screen	F : :	TTTAAAGAACCTCCCAAGACTGG	PCR selekce pozitivních KO klonů
	R : :	AACTCAGGCTCAGAAAATATGGAC	
hFN1 PCR screen over LA	F : :	TGAAGTTCACATATAATGCTTCCAC	PCR selekce pozitivních KO klonů
hFN1 exon EDB	F : :	CTGGACCAATGTTGGTGAATC	PCR
	R : :	TGGAGTACAATGTCAGTGTTT	
hFN1 exon EDB included	F : :	AGCCGGGCATTGACTATGAT	qPCR
	R : :	TGGACCAATGTTGGTGAATC	qPCR
hFN1 exon EDB excluded	F : :	GAGGAACAGCTGGGATGATG	qPCR
	R : :	TCACTATAGGGAGACCCAAGC	qPCR
hFN1 exon 38	F : :	CACCCAATTCCTTGCTGGTA	qPCR
	R : :	GGACCACTTCTCTGGGAGGA	qPCR

GAPDH	F :	ACATCGCTCAGACACCATGG	qPCR
	R :	GTAAAAGCAGCCCTGGTGA	qPCR
5S rRNA	F :	TCTCGTCTGATCTCGGAAGC	qPCR
	R :	AAGCCTACAGCACCCGGTAT	qPCR
hFN1 exon 24	R :	AGTTGGTTAAATCAATGGATG	RT
p1738	F :	CACCGCTAATTCAAAGCAACCG	sekvenace
p439m13	F :	GTAAAACGACGGCCAGT	sekvenace
p1635	F :	AGGGCCTATTTCCCATGATTCC	sekvenace
T7 promotor	F :	TAATACGACTCACTATA	sekvenace
random hexamers	--	NNNNNN	RT

### 3.6 Přístroje

analytické váhy KERN EG420-NM	Kern&Shon GmbH, SRN
aparatura na agarózovou elektroforézu	Biorad, USA
automatické pipety Pipetman	GILSON, FR
BIORAD IMAGER přístroj na analýzu gelu kamerou	Biorad, USA
centrifuga BIOFUGE pico Heraeus	Kendro, USA
centrifuga chlazená Eppendorf 5417 R	Eppendorf, SNR
centrifuga chlazená Eppendorf 5430 R	Eppendorf, SNR
centrifuga Eppendorf 5810 R	Eppendorf, SNR
centrifuga HERMLE 2 100M - stolní	Labnet, SRN
centrifuga na stočení qPCR destičky- Dráber	Eppendorf, SNR
inkubátor SANYO CO2	Schoeller instruments, SNR
inkubátor Raven 2	LTE Scientific, UK
laminární box Schoeller Biohazard Box EFIS 4BSC	Schoeller instruments, SNR
LightCycler <sup>R</sup> 480 II, přístroj na q-PCR	Roche, CHF
magnetická míchačka Stuart heat-stir CB 162	P-LAB a.s., ČR
mikroskop Olympus CKX41	Olympus, USA

mikroskop Olympus IINVER-IX51	Olympus, USA
PCR termo cycler MJ Mini Personal Thermal cycler	BIORAD, USA
PCR termo cycler T100	BIORAD, USA
spektrofotometr NanoDrop 1000	ThermoFisher scientific, USA
termoblok Dry Bath incubator	Major Science, USA
termoblok Thermomixer Comfort	Eppendorf, SRN
termotřepačka Orbi-safe TS NetWise	Schoeller instruments, SNR
termotřepačka MiniRocker MR-1	Biosan, LT
vodní lázeň Julabo 5	Julabo, USA
vortex VORTEX-2-GENIE	Scientific industries, USA
zdroj napětí Power Pac HC 250V/3,0A/300W	BIORAD, USA



## 4. METODY

### 4.1 Horizontální gelová agarózová elektroforéza

Horizontální gelová agarózová elektroforéza se řadí mezi separační metody a používá se k rozdělení molekul DNA či RNA na základně jejich velikosti (délky polynukleotidového řetězce). U DNA a RNA jsou jednotlivé nukleotidy spojeny esterovou vazbou mezi 3'OH hydroxylovou skupinou na ribóze jednoho nukleotidu a fosfátovou skupinou nacházející se na 5'-C druhého nukleotidu. Fosfátová skupina spojující nukleotidy má kyselý charakter, a pokud se DNA či RNA vyskytují v neutrálním či zásaditém pH, má záporný náboj. Proto pokud se molekuly DNA či RNA v neutrálním nebo zásaditém pH vyskytnou ve stejnosměrném elektrickém poli, budou přitahovány k anodě.

Agaróza je polysacharid skládající se z D-galaktosy a z 3,6-anhydrido-L-galaktopyranózy. Jednotlivé polysacharidové řetězce agarózy obsahují přes 800 molekul D-galaktosy a vytváří helikální fibrily, které jsou schopné agregovat a při přechodu do pevného stavu tvoří tří dimenzionální síť spojenou pomocí H- vazeb. Tato síť umožňuje dělení molekul podle velikosti. S rostoucí koncentrací agarózy, roste hustota této sítě a dochází k horší migraci-separaci velkých molekul.

K detekci molekul DNA či RNA se používají interkalační činidla. Tato činidla mají schopnost nekovalentně interagovat s polynukleotidovým řetězcem. Při navázání těchto činidel na DNA či RNA dochází k jejich konformační změně. Po ozáření UV světlem vykazují fluorescenci. Příkladem může být ethidiumbromid, který má schopnost se interkalovat mezi purinové či pyrimidinové báze dvoušroubovice DNA.

Molekuly DNA či RNA byly děleny podle velikosti agarózovou elektroforézou vždy v horizontálním uspořádání v 1 % agarózovém gelu v prostředí 1x TBE pufru (89 mM Tris base, 89 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA, pH 8,2). K detekci DNA či RNA byla použita látka Gelstar (ThermoFischer), která byla v 1 % agarózovém gelu přítomna v ředění 1: 10 000. Vzorky byly před nanesením do gelu smíchány v poměru 5:1 s roztokem 6x DNA Loading dey (10 mM Tris-HCl, 60% (v/v) glycerol, 0,03% (w/v) bromfenolová modř, 0,03% (w/v) xylenkyanol, 60 mM EDTA, pH 7,6). Aparatura pro agarózovou elektroforézu po nanesení vzorků byla připojena ke zdroji stejnosměrného napětí PowerPac HC (Biorad). Napětí bylo nastaveno na 7 V/cm, doba separace se lišila

podle velikosti molekul. Snímky agarózových gelů byly pořizovány na přístroji Gel Doc XR+ (Biorad) po osvětlení gelů UV zářením.

## **4.2 Transformace kompetentních bakterií *E. coli DH5α* teplotním šokem**

Při transformaci plazmidové DNA bylo používáno 50 ng DNA. Při transformaci ligačních směsí byla vždy použita polovina z celkového objemu ligační směsi. Kompetentní buňky *E. coli DH5α* byly vyjmuty z  $-80^{\circ}\text{C}$  a inkubovány 10 minut na ledu. Posléze k 50  $\mu\text{l}$  těchto buněk byla přidána plazmidová DNA či ligační směs a následovala inkubace po dobu 30 minut na ledu. Transformační směs byla poté vložena po dobu 45 s do vodní lázně temperované na  $42^{\circ}\text{C}$ , směs byla vrácena na led na 2 minuty. Poté bylo k směsi přidáno 500  $\mu\text{l}$  SOC média (0,2% (w/v) tryptofan, 0,05% (w/v) kvasinkový extrakt, 1 mM NaCl, 0,25 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 2 mM glukóza). Transformační směsi byly inkubovány v termotřepačce (Thermomixer Comfort, Eppendorf) při  $37^{\circ}\text{C}$ , 550 RPM po dobu 60 minut. 100  $\mu\text{l}$  této transformační směsi bylo posléze „vyseto“ na agarové plotny s LB médiem (1% (w/v) tryptofan, 0,5% (w/v) kvasinkový extrakt, 1% NaCl, pH 7,0) a příslušným antibiotikem. Takto připravené agarové plotny byly inkubovány v inkubátoru Raven 2, při teplotě  $37^{\circ}\text{C}$  po dobu 16 až 24 hodin.

## **4.3 Izolace genomové DNA**

Konfluentně narostlá kultura HeLa buněk v 6ti jamkové kultivační nádobě byla promyta 1 ml 1xPBS pufrem a bylo k ní přidáno 500  $\mu\text{l}$  0,5% roztoku trypsinu. Buňky byly umístěny do inkubátoru SANYO  $\text{CO}_2$  ( $37^{\circ}\text{C}$ , 5% (v/v)  $\text{CO}_2$ ) na 3 minuty. Posléze bylo do každé jamky přidáno 500  $\mu\text{l}$  DMEM média a buňky byly resuspendovány.

Poté byly přeneseny do 1,5 mililitrové mikrozkuhavky a následovala centrifugace v centrifuze Eppendorf 5417 R po dobu 5 minut při  $4^{\circ}\text{C}$  a  $1\ 000\times g$ . Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a buňky byly resuspendovány v 1 ml 1xPBS pufrem. Následovala centrifugace za stejných podmínek a resuspendování buněk v 1 ml 1xTAE pufrem. Poté byly buňky opět centrifugovány, supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v roztoku skládajícího se z 500  $\mu\text{l}$  1xTE pufrem, 20  $\mu\text{l}$  proteinázy K (20 mg/ml) a 25  $\mu\text{l}$  10% (v/v) SDS. Buňky byly inkubovány v termotřepačce MiniRocker MR-1, při  $45^{\circ}\text{C}$ , 400 RPM přes noc.

Poté bylo k lyzátu přidáno 400  $\mu$ l směsi fenolu:chloroformu:isoamylalkoholu (v/v, 25:24:1). A následovala inkubace v termotřepačce při 22°C, 450 RPM po dobu 10 minut. Bylo přepipetováno 350  $\mu$ l vzniklé vodné fáze do nové 1,5 ml mikrozkušavky a k vodné fázi bylo přidáno: 35  $\mu$ l 5,5 M octanu sodného (0,1xV) a 875  $\mu$ l 100 % EtOH (2,5xV). Následovala inkubace po dobu 30 minut při -20°C. Poté byl roztok centrifugován v chlazené centrifuzě po dobu 10 minut, při 14 000 $\times$ g a 4°C. Supernatant byl odstraněn a peleta byla dvakrát promyta 500  $\mu$ l 70% EtOH vždy s centrifugací po dobu 5 minut, při 14 000 $\times$ g a 4°C. Po poslední centrifugaci byl odstraněn supernatant a peleta byla vysušena při laboratorní teplotě.

Následně byla rozpuštěna v adekvátním množství deionizované vody. Koncentrace izolované genomové DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop 1000. Do jedné PCR reakce bylo použito 100 ng gDNA. Zbylá izolovaná genomová DNA byla skladována při -20°C.

## **4.4 Izolace RNA**

Konfluentně narostlá kultura HeLa buněk v 6ti jamkové kultivační nádobě byla promyta 1 ml 1xPBS pufru a bylo k ní přidáno 500  $\mu$ l TRIzol<sup>TM</sup> Reagent (ThermoFisher scientific). Následovala inkubace buněk s TRIzol<sup>TM</sup> Reagent při laboratorní teplotě po dobu 5 minut a občasného promíchání. Poté byly vzniklé lyzáty buněk přeneseny do 1,5 ml mikrozkušavek a bylo k nim napipetováno 125  $\mu$ l chloroformu (Fischer scientific). Vzniklý roztok byl vortexován po dobu 30 sekund a následně byly vzorky inkubovány po dobu 3 minut při laboratorní teplotě. Poté proběhla centrifugace na chlazené centrifuzě Eppendorf 5417 R po dobu 15 minut při 4°C a 14 000 $\times$ g. Po centrifugaci bylo 300  $\mu$ l vodné fáze přeneseno do nové 1,5 ml mikrozkušavky a následovala precipitace RNA (viz. kapitola 4.4.1).

### **4.4.1 Precipitace RNA**

K vodnému roztoku RNA bylo přidáno: 0,5xV 7,5 M octanu amonného a 2,5xV 100% EtOH. Vzniklý roztok byl inkubován při -80°C minimálně 60 minut. Poté následovala centrifugace na chlazené centrifuzě Eppendorf 5417 R po dobu 10 minut při 4°C a 14 000 $\times$ g. Supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 500  $\mu$ l 70% EtOH. Poté se roztok centrifuguje po dobu 5 minut při 4°C a 14 000 $\times$ g. Promytí 70% EtOH bylo ještě 1x opakováno a po centrifugaci byl odstraněn supernatant a peleta RNA nechána

vyschnout při laboratorní teplotě. Poté byla peleta rozpuštěna v 30  $\mu$ l deionizované vody bez nukleás (Nuclease-free water, Invitrogen). Koncentrace RNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop 1000.

#### 4.4.2 Ošetření izolované RNA pomocí DNAsyI

K 20  $\mu$ g izolované RNA bylo přidáno 5,0  $\mu$ l 10x pufru pro DNAsuI (ThermoFischer scientific) a 2,0  $\mu$ l DNAsyI (ThermoFischer scientific) směs byla doplněna deionizovanou vodou bez nukleás (Invitrogen) do celkového objemu 50  $\mu$ l. Směs byla inkubována po dobu 30 minut při 30 °C v termobloku Dry Bath incubator (Major Science). Po uplynutí inkubační doby byla ze směsi vyprecipitována RNA. Precipitace byla provedena jako v kapitole 4.4.1.

#### 4.5 Reverzní transkriptce – syntéza cDNA

K syntéze komplementární DNA (cDNA) byla použita reverzní transkriptáza SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Ke 2,0  $\mu$ g RNA ošetřené DNAsouI byl přidán 1,0  $\mu$ l 10 mM roztoku dNTP, 1,0  $\mu$ l 2,5 pmol roztoku primerů random hexamers a objem byl doplněn deionizovanou vodou bez nukleás do objemu 14,5  $\mu$ l. Připravený roztok byl inkubován při 65 °C po dobu 5 minut. Posléze byl do roztoku přidán: 1,0  $\mu$ l 0,1 M roztoku DTT, 4,0  $\mu$ l 5x First Strand pufru a 0,5  $\mu$ l reverzní transkriptázy SuperScript™ III (200 U/  $\mu$ l), celkový objem reakce tak činil 20,0  $\mu$ l. Roztok pro reverzní transkripci byl krátce vortexován a poté krátce centrifugován na stolní mikrocentrifuze HERMLE 2 100M (Labnet). Následně se v thermocycleru PCR termo cycler T100 (Biorad) nechal proběhnout cyklus: 5 minut 25°C, 60 minut 50°C a 15 minut 70°C. V posledním kroku dochází k teplotní inaktivaci enzymu a zastavení reakce.

#### 4.6 Tkáňové kultury

Predikovaný transkripční enhancer pro gen *FNI* byl deletovaný v HeLa buněčné linii, která je odvozena z buněk cervikálního karcinomu Henrietty Lacksové a je nejstarší a nejvíce používanou lidskou buněčnou linií (Scherer et al., 1953). Ve všech experimentech bude používána pouze tato buněčná linie.

Buňky byly kultivovány v inkubátoru SANYO CO<sub>2</sub> (Schoeller instruments) při 37°C, 5% CO<sub>2</sub> v Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich), koncentrace glukózy v tomto médiu je 4,5 g/l. Do tohoto média bylo dále přidáno 10%

(v/v) telecího séra (FBC, Biochrom) a 1% (v/v) Penicillinu/Streptomycinu (Pen Strep, 5 000 U/ml, ThermoFisher scientific).

Při tvorbě HeLa KO buněčných linií bylo nutno buňky selektovat po jednotlivých buňkách (single cell sorting). Tyto buňky byly dále inkubovány v 96ti jamkové kultivační nádobě a to v kondiciovaném médiu. To se skládalo v poměru 1:1 z nového DMEM média a z DMEM média, které bylo 24 hodin inkubováno společně z konfluentně narostlou kulturou HeLa buněk a posléze bylo zfiltrované přes 0,22  $\mu\text{m}$  filtr. Toto kondiciované médium obsahovalo také 15 % (v/v) FBS séra a 1 % (v/v) Pen Strep.

#### 4.7 Transfekce HeLa buněk plazmidy

HeLa buňky byly transfekovány ze dvou důvodů. V prvním případě se testovala funkčnost jednotlivých gRNA v připravených plazmidech. V druhém případě byly HeLa buňky transfekovány směsí pro tvorbu KO buněčných linií. V obou případech se k transfekci používal Lipofectamin LTX (Invitrogen).

Při testování funkčnosti gRNA bylo v prvním roztoku smícháno 800 ng plazmidové DNA (plazmidy: pX330-5'gRNA,3'gRNA a pAVR-3'B či pAVR-5'B v poměru 1:1) se 125  $\mu\text{l}$  Opti-MEM média (ThermoFisher scientific) a 2  $\mu\text{l}$  PlusDNA Reagent (Invitrogen). Ve druhém roztoku byly smíchány 2  $\mu\text{l}$  Lipofectaminu LTX se 125  $\mu\text{l}$  Opti-MEM média. Tyto připravené roztoky se nechaly inkubovat po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byly smíchány dohromady a následovala další 20ti minutová inkubace při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla transfekční směs přidána k 70% konfluentní HeLa buněčné kultuře v Opti-MEM médiu. HeLa buňky se nechaly s transfekční směsí po dobu 8 hodin při 37 °C a 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, poté bylo Opti-MEM médium vyměněno za DMEM médium s 10% (v/v) FBS a 1% (v/v) Pen Strep. HeLa buňky byly inkubovány po dobu 48 hodin, 37°C a 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, než byla funkčnost jednotlivých gRNA ověřena pomocí fluorescence pro RFP.

Transfekce HeLa buněk za účelem tvorby KO buněčných klonů se prováděla totožným postupem. Rozdíl byl pouze ve složení transfekčních směsí. První transfekční směs obsahovala 24  $\mu\text{g}$  DNA (plazmidy: pX330-5'gRNA,3'gRNA a pAVR-3'B a homologní templát LA-RA v poměru 1:1:1) s 250  $\mu\text{l}$  Opti-MEM média a 5  $\mu\text{l}$  PlusDNA Reagent. Druhá transfekční směs se skládala z 20  $\mu\text{l}$  Lipofectaminu LTX ve 250  $\mu\text{l}$  Opti-MEM média. Po 48 hodinové inkubaci následovala selekce buněk (viz kapitola 4.13).

## 4.8 Izolace plazmidové DNA, DNA z gelu, produktů PCR

Izolace plazmidové DNA probíhala z kultury bakterií *E. coli* kmen DH5 $\alpha$ , která byla předtím transformována příslušným plazmidem. Bakteriální kolonie byly 16-24 hodin před izolací zaočkovány do 5 ml LB média s patřičným antibiotikem a inkubovány při 37°C za neustálého třepání v termotřepače Orbi-safe TS NetWise (Schoeller instruments). Po inkubaci byla plazmidová DNA izolována přesně podle protokolu, který byl přiložen u QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Izolovaná DNA byla eluována do 50  $\mu$ l deionizované vody. Koncentrace a kvalita plazmidové DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop1000.

Izolace produktů PCR probíhala podle protokolu pro QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN). Produkty PCR byly posléze eluovány do 30  $\mu$ l deionizované vody. Jejich koncentrace a kvalita byla kontrolována na spektrofotometru NanoDrop1000.

Izolace fragmentů DNA z agarózového gelu se prováděla podle protokolu pro Zymoclean<sup>TM</sup> Gel DNA Recovery (Zymo research). Vyjímka oproti protokolu byla ta, že po vyřezání fragmentů DNA z gelu, nebyly tyto fragmenty váženy, ale vždy k nim byl přidán 1 ml ADB (Agarose Dissolving Buffer) a dále se postupovalo již podle protokolu. DNA izolovaná z gelu byla eluována do 10  $\mu$ l deionizované vody. Koncentrace a kvalita izolované DNA byla kontrolována pomocí spektrofotometru NanoDrop1000.

## 4.9 Sekvenační analýza

Sekvence veškerých připravených plazmidů či produktů PCR byla provedena firmou SEQme s.r.o. (Dlouhá 176, 26301 Dobříš, Česká republika). Kontrola správnosti obdržené sekvence byla provedena v programu SnapGene.

Při sekvenování plazmidové DNA bylo v reakci odesílané na sekvenaci smícháno 500 ng DNA, 25 pmol primeru a reakce byla doplněna do 10  $\mu$ l deionizovanou vodou. Pokud byl sekvenován produkt PCR, bylo složení reakce totožné, vyjma množství DNA, které činilo 50 ng.

## 4.10 PCR

PCR metoda umožňuje rychlou amplifikaci konkrétního úseku DNA, který je ohraničen párem primerů – krátkých oligonukleotidů, ty jsou komplementární ke koncům amplifikovaného úseku DNA. Princip metody je založen na opakování cyklu, který obsahuje denaturační fázi, fázi nasedání primerů a elongační fázi, při které dochází

k syntéze nových kopií DNA. K silnému rozvoji této metody napomohlo objevení termostabilní DNA polymerázy Taq, která byla izolovaná z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*.

Pro každý pár primerů před prvním použitím bylo vždy připraveno 8 reakcí PCR o objemu 10 µl a dané reakce se nechaly proběhnout za rozdílných teplot pro nasedání primerů. Teplotní gradient se nacházel v rozmezí mezi 55 a 75°C. Po proběhnutí PCR se produkty reakcí analyzovaly na 1% agarózovém gelu a byla vybrána nejvhodnější teplota pro nasedání primerů na DNA.

#### 4.10.1 Charakterizace HeLa KO linií

Pro charakterizaci HeLa linií, které mají deletovaný predikovaný transkripční enhancer, byly navrženy dva páry primerů. První pár primerů se nacházel v těsné blízkosti deletované sekvence a oba primery se nacházely v sekvenci homologního templátu, který byl HeLa buňkám poskytnut při transfekci. Produkt PCR je krátký a lze předpokládat, že jeho amplifikace bude probíhat efektivně. Druhý pár primerů, byl navržen tak, že forwardový primer se nachází mimo sekvenci homologního templátu. Tím narostla délka produktu PCR a klesla efektivita amplifikace. Tento pár primerů slouží k potvrzení delece sekvence predikovaného transkripčního enhanceru a také vyvrací možnost náhodné inkorporace homologního templátu do genomu HeLa buněk při transfekci.

Jako templát byla použita izolovaná genomová DNA z HeLa buněčných klonů. Do každé PCR reakce bylo použito 100 ng gDNA jako templát. Pro amplifikaci DNA se použila termostabilní polymeráza Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFischer scientific).

templátová DNA - gDNA	100 ng
primer F (10 µM)	1,0 µl
primer R (10 µM)	1,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,6 µl
betaine (2,5 M)	8,0 µl
DMSO (100% (v/v))	0,7 µl
5x Phusion HF Buffer for GC rich	4,0 µl
Phusion High-Fidelity DNA polymeráza	0,2 µl
dH <sub>2</sub> O	doplnit do 20 µl

Tabulka č. 4.1 Složení směsi PCR pro nalezení HeLa KO linií

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	98,0 °C	3 min	1x
denaturace	98,0 °C	30 s	35x
nasedání primerů	65,2 °C	30 s	
elongace	72,0 °C	90 s	
konečná elongace	72,0 °C	7 min	1x

Tabulka č. 4.2 Program pro PCR

Program pro PCR popsany v tabulce č. 4.2 je pro první navržený pár primerů (hFN1 PCR screen). V případě druhého kola selekce se forwardový primer nachází mimo sekvenci homologního templátu a byl navázán F:hFN1 PCR screen over LA a jako reverzní primer byl použit identický primer jako v prvním navrženém páru primerů. PCR v druhém kole selekce probíhala za stejného složení jako v tabulce č. 4.1. Změna byla v programu PCR, program byl identický jako v tabulce č. 4.2 až na teplotu nasedání primerů, ta byla 61,0 °C a doba elongace činila 3 minuty.

#### 4.10.2 Semikvantitativní PCR na detekci množství exonu EDB

Primery použité k detekci exonu EDB byly nazývány FibA a FibB a sekvence je popsána v kapitole 3.5. Jako templát byla použita cDNA z HeLa KO buněčných linií. Do každé PCR reakce bylo použito 1,5 µl cDNA. Pro amplifikaci DNA se použila termostabilní polymeráza Taq (ThermoFischer scientific). Po proběhnutí programu byly produkty PCR analyzovány na 1% agarózovém gelu.



cDNA	1,50 µl
F: FibA (10 µM)	0,25 µl
R: FibB (10 µM)	0,25 µl
dNTPs (10 mM)	0,38 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,50 µl
10x Taq pufr s KCl	1,50 µl
Taq polymeráza	0,40 µl
dH <sub>2</sub> O	doplnit do 15 µl

Tabulka č. 4.3 Složení směsi pro semikvantitativní PCR

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	95,0 °C	3 min	1x
denaturace	95,0 °C	30 s	28x
nasedání primerů	60,0 °C	30 s	
elongace	72,0 °C	30 s	
konečná elongace	72,0 °C	5 min	1x

Tabulka č. 4.4 Program pro semikvantitativní PCR

#### 4.10.3 PCR pro přípravu plazmidu nesoucího 5'gRNA a 3'gRNA

K přípravě plazmidu nesoucího jak 5'gRNA tak 3'gRNA, tento plazmid posléze nese označení pX330-5'gRNA-3'gRNA, bylo nutné do plazmidu pX330-5'gRNA vnést z plazmidu pH1-3'gRNA úsek obsahující promotor hH1, 3'gRNA a tracer RNA.

K tomuto účely byly navrženy primery F:hFN1e G1-3'XbaI a R:hFN1e G1-3'KpnI. Jako templát bylo použito 25 ng plazmidu pH1-3'gRNA. Pro amplifikaci DNA se použila termostabilní polymeráza Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFischer scientific).

templátová DNA – pH1-3'gRNA	25 ng
primer F (10 µM)	2,5 µl
primer R (10 µM)	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,0 µl
betaine (2,5 M)	20,0 µl
DMSO (100 % (v/v))	1,5 µl
5x Phusion HF Buffer for GC rich	10,0 µl
Phusion High-Fidelity DNA polymeráza	0,63 µl
dH <sub>2</sub> O	doplnit do 50 µl

Tabulka č. 4.5 Složení směsi PCR pro amplifikaci úseku obsahující promotor *hHI*, 3'gRNA a tracer RNA

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	98,0 °C	90 s	1x
denaturace	98,0 °C	15 s	36x
nasedání primerů	65,2 °C	20 s	
elongace	72,0 °C	60 s	
konečná elongace	72,0 °C	7 min	1x

Tabulka č. 4.6 Program pro PCR pro amplifikaci úseku obsahující promotor *hHI*, 3'gRNA a tracer RNA

## 4.11 RT-qPCR

K detekci relativního množství mRNA pro alternativní exon EDB genu *FNI* byla použita RT-qPCR (real time – quantitative PCR). Detekce byla prováděna na přístroji LightCycler<sup>R</sup> 480 II (Roche). Sekvence primerů použitých v této metodě jsou popsány v kapitole 3.5. Komplementární DNA byla ředěna v poměru 1:4 a všechny vzorky byly nanášeny na destičku pro RT-qPCR v tripletech.

5x ředěná cDNA	2,00 µl
2x SYBR Master Mix (Roche, CHF)	2,50 µl
F primer (5 µM)	0,25 µl
R primer (5 µM)	0,25 µl

Tabulka č. 4.7 Složení směsi pro kvantitativní PCR

Krok		Teplota	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace		95,0 °C	7 min	1x
kvantifikace	denaturace	95,0 °C	20 s	45x
	nasedání primerů	61,0 °C	20 s	
	elongace	72,0 °C	35 s	
kvalifikační křivek tání	denaturace	95,0 °C	7 min	1x
	postupné ochlazování	95,0 - 55,0 °C	61 s	
		37,0 °C	61 s	

Tabulka č. 4.8 Program pro kvantitativní PCR

Efektivita amplifikace pro jednotlivé primery byla získána z kalibrační křivky. cDNA byla naředěna: 5x, 50x, 500x, 5 000x a 50 000x. Průměrné Ct hodnoty získané po proběhnutí kvantitativní PCR byly vyneseny do křivky. Body byly proloženy přímkou. Hodnota směrnice přímky byla posléze přímou úměrou vztažena k hodnotě -3,32, která odpovídá 100 % efektivitě amplifikace. Pro primery referenčních genů: GAPDH a 5S rRNA byla efektivita měřena třikrát a dále se používal průměr těchto efektivit amplifikace. Pro primery mapující gen *FNI* byla efektivita amplifikace měřena při každém provedení experimentu.

Relativní transkripce genu *FNI* po delecii transkripčního enhanceru byla vypočtena vztažením průměrných Ct hodnot pro exon 38 z HeLa KO linií na HeLa WT linii.

$$N_{rel.transkripce} = E_{f_{rel.transkripce}}^{(Ct_{HeLa WT} - Ct_{HeLa KO})}$$

Zahrnutí EDB exonu (EDB included) či přeskočení EDB exonu (EDB excluded) bylo vypočteno obdobným způsobem. Následně tyto hodnoty zahrnutí či přeskočení EDB exonu byly normalizovány na relativní transkripci genu *FNI* pomocí detekovaného množství exonu 38.

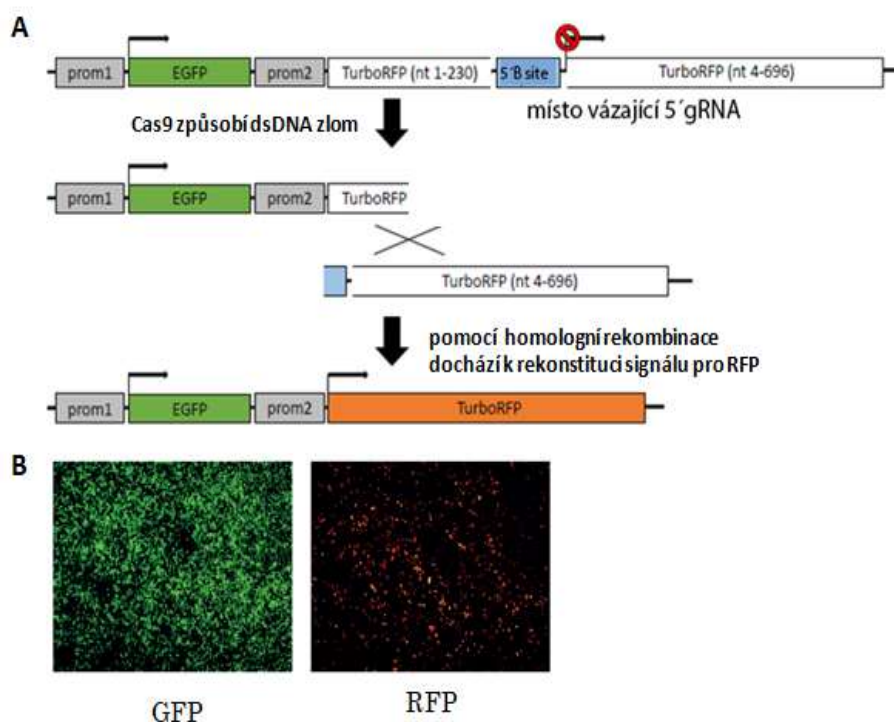
$$N_{EDB\ included} = \frac{E_{f_{EDB\ included}}^{(Ct_{HeLa WT} - Ct_{HeLa KO})}}{E_{f_{rel.transkripce}}^{(Ct_{HeLa WT} - Ct_{HeLa KO})}} \quad N_{EDB\ excluded} = \frac{E_{f_{EDB\ excluded}}^{(Ct_{HeLa WT} - Ct_{HeLa KO})}}{E_{f_{rel.transkripce}}^{(Ct_{HeLa WT} - Ct_{HeLa KO})}}$$

#### 4.12 CRISPR/Cas9 – testování funkčnosti gRNA

Pro otestování funkčnosti gRNA jsme použili plazmid pAVR-GFP-RFP. Mechanismus, jakým pracuje tento reportérový systém, je popsán na Obrázku č. 4.1.

Reportérový systém pAVR-GFP-RFP obsahuje gen pro GFP. Signál pro GFP pak dává informaci o množství buněk, které byly transfekovány tímto plazmidem. Dále tento systém obsahuje dvě sekvence kódující RFP, ani jedna z těchto sekvencí pro RFP není kompletní. První sekvence obsahuje pouze prvních 230 nt pro RFP a druhá sekvence postrádá první tři nukleotidy. Z žádné z těchto dvou sekvencí nemůže vzniknout funkční RFP. Mezi tyto dvě části je vkládána sekvence, kterou by měla rozpoznat gRNA. Pokud je gRNA funkční, vznikají v místě této sekvence DSB. Poté může docházet k homologní rekombinaci mezi dvěma sekvencemi kódujícími RFP a výsledkem je rekonstituovaná sekvence pro RFP. Tento celý proces se pak projeví vznikem signálu pro RFP pod

fluorescenčním mikroskopem. Ze vzniku a množství tohoto signálu lze přibližně říci, zdali gRNA rozpoznává předpokládanou sekvenci a je schopna v jejím místě způsobit DSB.



**Obrázek č. 4.1 Schéma reportérového systému pAVR-GFP-RFP**

(A) Mechanismus jakým dochází k rekonstituci sekvence pro RFP, pokud je gRNA funkční a je schopna způsobit DSB v předpokládané sekvenci.

(B) Snímky z fluorescenčního mikroskopu. Snímek se signálem pro GFP ilustruje množství transfekovaných buněk, v kterých se nachází plazmid pAVR-GFP-RFP. Snímek se signálem pro RFP ilustruje množství buněk, v kterých proběhla rekonstituce sekvence pro RFP.

### 4.13 Selekcce HeLa buněk pomocí průtokové cytometrie

Buňky, které byly transfekovány transfekční směsí obsahující plazmidy: pX330-5'gRNA, 3'gRNA a pAVR-3'B a homologní templát LA-RA v poměru 1:1:1, byly inkubovány po transfekci ještě 48 hodin, při 37°C a 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Poté byly za pomoci trypsinu převedeny do buněčné suspenze. Centrifugovány po dobu 5 minut při 1 000×g. Vzniklý supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 1 ml 1x PBS. Dále byla tato buněčná suspenze uchovávána na ledu. Buňky byly obarveny barvou Hoechst 33342 (ThermoFischer scientific), obarveny byly pouze apoptické či již mrtvé buňky a při následné selekci byly tedy vybrány pouze vitální buňky.

Takto připravené buňky byly selektovány pomocí průtokového cytometru. Manipulace s přístrojem a proces selekce buněk byl proveden Zdeňkem Cimbůrkem či Mgr. Matyášem Šimou ze Servisní laboratoře průtokové cytometrie z Ústavu molekulární

genetiky AV ČR, v. v. i.. Selektované buňky musely vykazovat určitou hladinu signálu pro GFP a RFP a nesměly vykazovat signál pro barvivo Hoechst 33342. Buňky byly selektovány do 96ti jamkové kultivační nádoby, ve které se nacházelo kondicionované médium. Do jedné jamky v 96ti jamkové kultivační nádobě byla selektována vždy jedna buňka. Následnou kultivací a selekcí pomocí PCR jsme tak získali HeLa KO linie, které byly odvozeny z jedné buňky.

#### **4.14 Predikce transkripčního enhanceru pro gen *FNI***

K predikci byly použity dva veřejně dostupné programy The Ensembl Regulatory Build a FANTOM 5 (Zerbino et al., 2015, The FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT), 2014).

The Ensembl Regulatory Build využívá veřejně dostupná data o epigenetických modifikacích a místech vazby transkripčních faktorů z různých lidských buněčných typů. Z těchto dat pak vytváří přehledný souhrn o regulačních oblastech v lidském genomu.

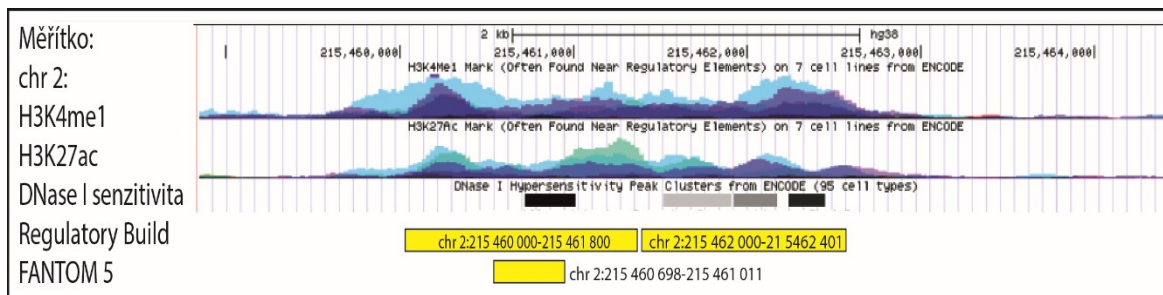
Data pro The Ensembl Regulatory Build byla získána z projektů ENCODE 2 a Epigenomics Roadmap, což jsou projekty zaměřené na anotaci a popis všech funkčních elementů lidského genomu. Byla využita data z ChIP-Seq experimentů pro CTCF, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, H3K27me3, H3K36me3, H4K20me1 a o hypersenzitivitě k DNaseI z 18 rozdílných buněčných linií. Z těchto dat byl vytvořen profil genomu. Porovnáváním profilů známých regulačních elementů a hledáním podobností byly určité části genomu anotovány a rozděleny do těchto kategorií: predikovaný promotor s TSS, predikovaná transkripčně aktivní oblast, predikovaná oblast obklopující promotor, predikovaný transkripční enhancer, predikovaný represor, oblast s predikovanou nízkou aktivitou, predikovaný heterochromatin. Predikce se zaměřili pouze na oblasti asociované s regulací transkripce. Takto anotované oblasti tvořily 12,9 % lidského genomu.

K potvrzení správnosti anotace byly například transkripční enhancery predikované programem The Ensembl Regulatory Build porovnány s 882 potvrzenými lidskými enhancery z projektu VISTA. Shoda mezi těmito množinami činila 92,4 %. Dále byly predikované enhancery porovnány ještě s 38 533 enhancery, které byly predikované programem FANTOM 5. Shoda v tomto případě činila 80,3 %.

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1 Predikce transkripčního enhanceru

K predikci transkripčního enhanceru genu *FNI* byly použity programy The Ensemble Regulatory Build a FANTOM 5 popsané v kapitole 4.13.



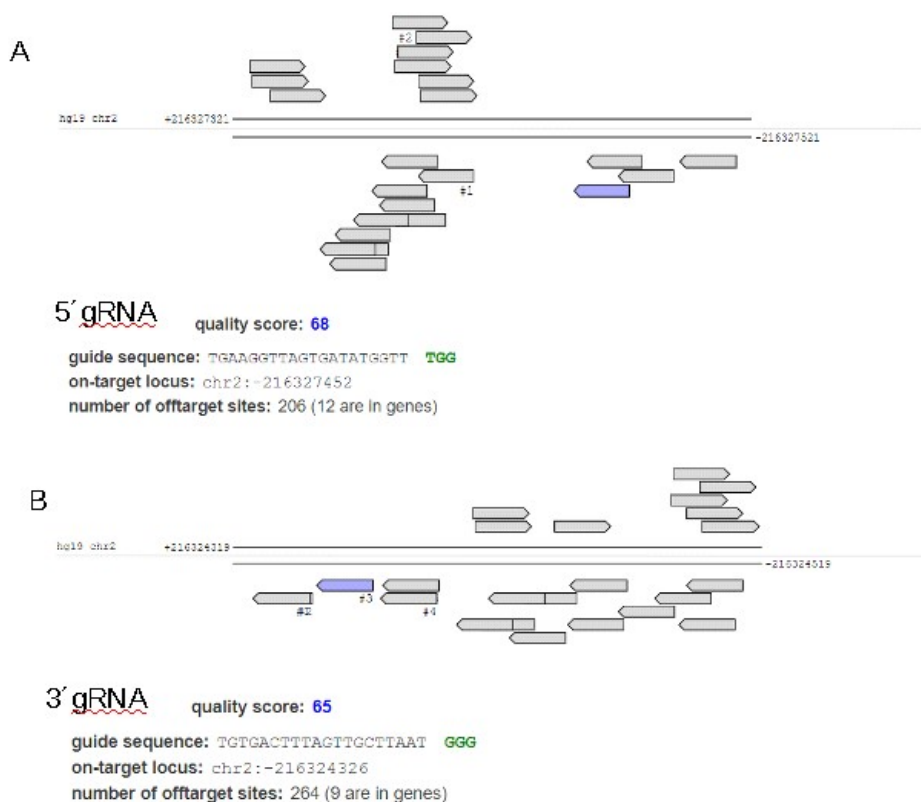
**Obrázek č. 5.1** Predikce transkripčních enhancerů

Program Regulatory Build predikoval dva transkripční enhancery nacházející se přibližně 23,5 kbp před TSS genu *FNI*. První transkripční enhancer se nacházel v oblasti chr 2:215 460 000-215 461 800. Druhý transkripční enhancer má koordináty chr 2:215 462 000-21 5462 401. Program FANTOM 5 predikoval v této oblasti jeden transkripční enhancer s koordinátami chr 2:215 460 698-215 461 011. V těchto oblastech se nacházela H3K27ac, která je spjata s rozvolněnou strukturou chromatinu. Stejně tak senzitivita k DNase I značí dekonzenzovaný stav chromatinu. H3K4me1 je často asociována s transkripčními enhancery.

Oba programy identifikovaly oblast nacházející se přibližně 23,5 kbp před místem začátku transkripce (TSS) pro gen *FNI* jako transkripční enhancer. Program Regulatory Build identifikoval dvě sekvence, nacházející se vedle sebe a mělo by se jednat o dva nezávislé transkripční enhancery. Program FANTOM 5 identifikoval v této oblasti krátký transkripční enhancer (313 bp), překrývající se polohou s prvním transkripčním enhancerem. Délka predikovaných transkripčních enhancerů programem Regulatory Build činila 2 401 bp. Tuto sekvenci jsme se rozhodli deletovat pomocí CRISPR/Cas9 systému.

## 5.2 Návrh gRNA

K návrhu gRNA byl použit veřejně dostupný program navržený laboratoří Fenga Zhanga, Ph.D z MIT (<http://crispr.mit.edu/>). Predikovaný transkripční enhancer měl délku 2 401 bp. 5'gRNA a 3'gRNA byly hledány v oblasti 200 bp před a za predikovaným transkripčním enhancerem. Výsledky predikce můžeme pozorovat na Obrázku č. 5.2.



### Obrázek č. 5.2 Predikce jednotlivých gRNA

(A) Znárodnění všech možných predikovaných 5'gRNA v úseku 200 bp, nacházející se před 5'koncem predikovaného transkripčního enhanceru. Vybraná 5'gRNA je mezi ostatními návrhy označena modře. Následují charakteristiky 5'gRNA: sekvence, PAM motiv, její umístění v genomu a seznam off-tragetových sekvencí.

(B) Znárodnění predikovaných 3'gRNA v úseku 200 bp, nacházející se za 3'koncem predikovaného transkripčního enhanceru. Vybraná 3'gRNA je mezi ostatními návrhy označena modře. Následují charakteristiky 3'gRNA: sekvence, PAM motiv, její umístění v genomu a seznam off-tragetových sekvencí.

Z predikce gRNA byly vybrány gRNA s nejvyšším dosaženým skórem. To se odvíjí od dostupnosti cílové sekvence, jestli je daná sekvence schopná tvořit sekundární struktury či nikoliv a podle množství částečně komplementárních sekvencí (falešně pozitivní signál).



### 5.3 Příprava CRISPR/Cas9 systému

Navržené gRNA z předchozí kapitoly bylo nutné zaklonovat do patříčích plazmidů. Dále bylo nutné připravit testovací systém pro zjištění funkčnosti gRNA a připravit plazmid s homologním templátem, který bude sloužit k HDR při tvorbě HeLa KO linií. Všechny plazmidy, které byly připraveny pro CRISPR/Cas9 systém, jsou uvedeny v Tabulce č. 5.1.

Název	Popis	Název použitých primerů	Klonovací technika	Kontrolní štěpení	Sekvenační primer
pX330-5'gRNA	5'gRNA s U6 promotorem	F+R: hFN1e1 5'G2 pX330	BbsI	ne	p1635
phH1-3'gRNA	3'gRNA s hH1 promotorem	F+R: hFN1e1 3'G1 phH1	BbsI	ne	p439m13
pX330-5'gRNA 3'gRNA	5'gRNA-U6 promotor a 3'gRNA-hH1 promotor	F: hFN1e1 G1-3' XbaI + R:hFN1e1 G1-3' KpnI	XbaI/Kpn	ApaI	p1635
pAVR-5'B	testovací systém pro 5'gRNA	F+R: hFN1e1 5'boundary pAVR	PvuI/EcoRV	BamHI	p1783
pAVR-3'B	testovací systém pro 3'gRNA	F+R: hFN1e1 3'boundary pAVR	PvuI/EcoRV	BamHI	p1738
pBlueskript-LA	levá část templátu pro HDR	F: hFN1 LA BamHI + R: hFN1 LA EcoRI	BamHI/EcoRI	SacI	T7 a T3 promotor
pBlueskript-LA-RA	kompletní homologní templát pro HDR (LA-RA)	F: hFN1 RA EcoRI + R: hFN1 RA HindIII.	EcoRI/HindIII	Hpa/NcoI	hFN1 PCR screen a T3 promotor

Tabulka č. 5.1 Seznam plazmidů připravených pro CRISPR/Cas9 systém

Plazmidy, do kterých byly zaklonovány jednotlivé gRNA, vazebné sekvence pro gRNA a homologní templát jsou: pX330-prázdný, phH1-prázdný, pAVR-prázdný a pBlueskript-prázdný. Plazmid pX330-prázdný obsahuje humanizovanou verzi endonukleázy Cas9, U6 promotor, tracer RNA a resistenci na ampicilin. Plazmid phH1 obsahuje promotor H1, tracer RNA a resistenci na kanamycin. Plazmid pAVR-prázdný byl popsán v kapitole 4.12 a obsahuje resistenci na blasticidin. Plazmid pBlueskript obsahuje resistenci pro ampicilin.

V případě gRNA a vazebných sekvencí pro gRNA je sekvence, kterou je nutno vložit do prázdných plazmidů, obsažena již v sekvenci primerů. Proto se tyto primery nechaly spárovat, byly fosforylovány a následovala ligace s patříčím prázdným

plazmidem, který byl naštěpen endonukleázou uvedenou v Tabulce č. 5.1. V případě plazmidu pX330-5'gRNA,3'gRNA bylo nutno pomocí PCR amplifikovat úsek DNA z plazmidu pH1-3'gRNA (viz kapitola 4.10.3) a poté následovalo štěpení restričními endonukleásami a ligace. Plazmidy pBlueskript-LA a pBlueskript-LA-RA obsahovaly homologní templát pro HDR opravu. Jednotlivé úseky pro homologní templát označované jako LA a RA byly získané pomocí PCR z genomové DNA HeLa WT buněčné linie (viz kapitola 4.10.1).

Správnost všech připravených plazmidů byla potvrzena pomocí restričního štěpení a sekvenční analýzy (viz kapitola 4.9).

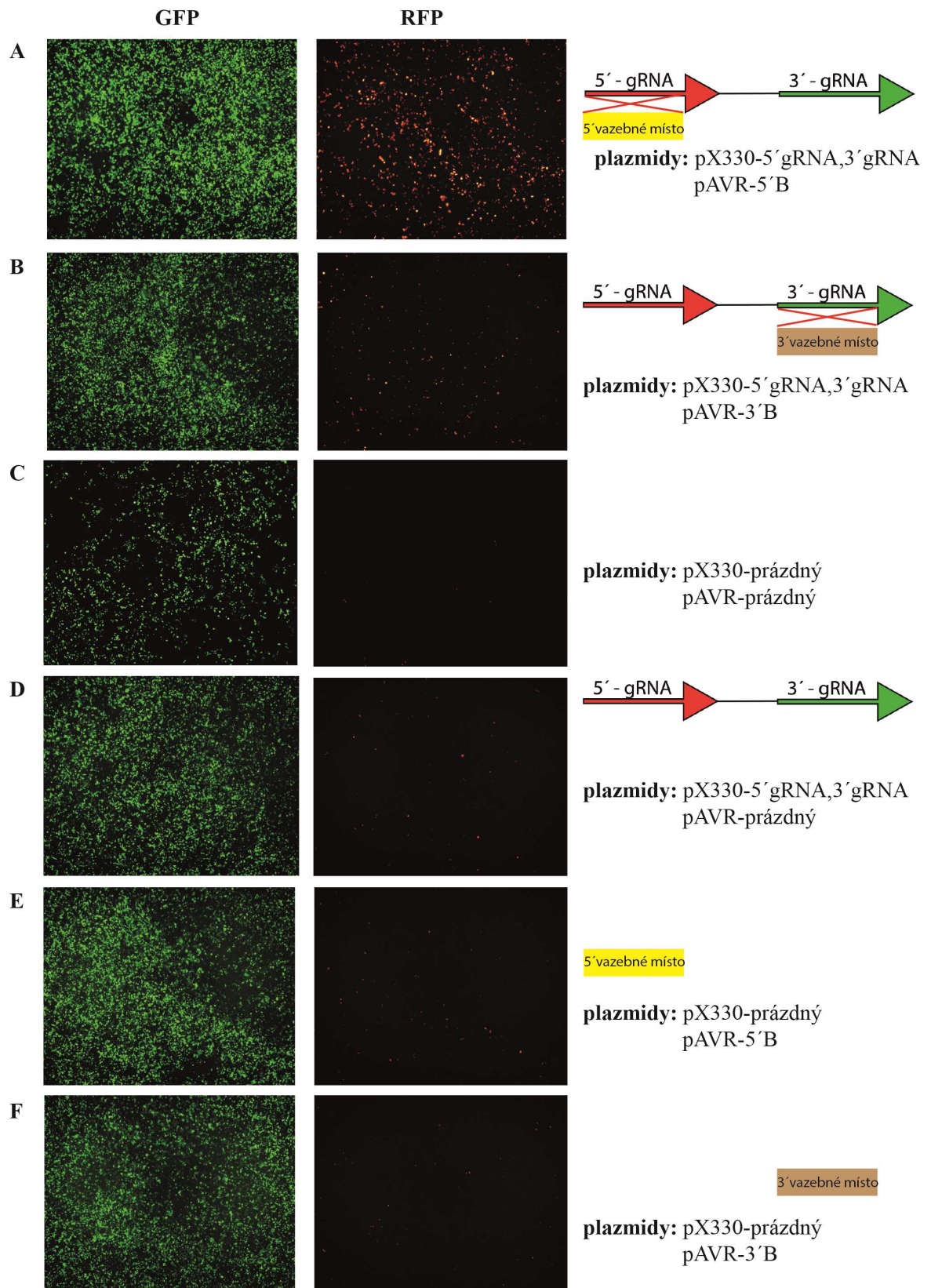
## 5.4 Testování funkčnosti gRNA

Poté, co byly připraveny všechny požadované plazmidy, bylo nutné otestovat, zdali vybrané gRNA jsou schopny rozpoznávat cílové sekvence a způsobit vznik dvojvláknových zlomů v DNA (viz kapitola 1.6). K tomuto účelu jsme se rozhodli využít pAVR-GFP-RFP reportérový systém, jehož mechanismus je popsán v kapitole 4.12.

HeLa buňky byly transfekovány pomocí Lipofectaminu LTX různými kombinacemi plazmidů: pX330-5'gRNA,3'gRNA, pAVR-5'B, pAVR-3'B, pX330-prázdný, pAVR-prázdný. Plazmidy pX330-prázdný, pAVR-prázdný a jejich kombinace sloužili jako negativní kontroly. Po 48 hodinách od transfekce byly pořízeny snímky na fluorescenčním mikroskopu pro GFP a RFP signál. Signál pro GFP sloužil ke zjištění množství transfekovaných buněk. Signál pro RFP udával počet buněk, u kterých došlo k rekonstrukci sekvence pro RFP. Aby mohlo dojít k rekonstrukci sekvence pro RFP, muselo předtím dojít ke vzniku DSB a musela proběhnout oprava tohoto zlomu pomocí mechanismu HDR. Signál pro RFP tedy byť nepřímo, odpovídá schopnosti gRNA rozpoznat komplementární sekvenci, se kterou má asociovat a způsobit tvorbu DSB.

Jak je patrné z Obrázku č. 5.4, signál pro GFP je silný ve všech testovaných vzorcích. Transfekce HeLa buněk byla úspěšná. V případě, kdy byla testována 5'gRNA, lze pozorovat značný signál pro RFP (Obrázek č. 5.3 A). 5'gRNA je z plazmidu pX330-5'gRNA,3'gRNA správně přepisována a je schopna najít svou komplementární sekvenci a způsobovat DSB. 3'gRNA vykazuje oproti 5'gRNA snížení signálu pro RFP. 3'gRNA je buď z plazmidu méně transkribována, či není schopná tak efektivně asociovat se svojí komplementární sekvencí a působit DSB. V porovnání signálu RFP pro 3'gRNA s negativními kontrolami (Obrázek č. 5.3 C, D, F) lze ale stále pozorovat signifikantní zvýšení signálu RFP.

Z testování gRNA je patrné, že obě vybrané gRNA jsou schopny nalézt cílovou sekvenci a působit DSB. Efektivita gRNA je ale značně rozdílná. 5'gRNA se zdá být podle tohoto testu účinnější než 3'gRNA. Při tvorbě HeLa KO linií se tak buňky budou selektovat na RFP signál pocházející z činnosti 3'gRNA. Předpokladem tohoto kroku je, že pokud 3'gRNA byla schopna v buňce způsobit DSB, stejný proces provedla i 5'gRNA, která má vyšší účinnost.

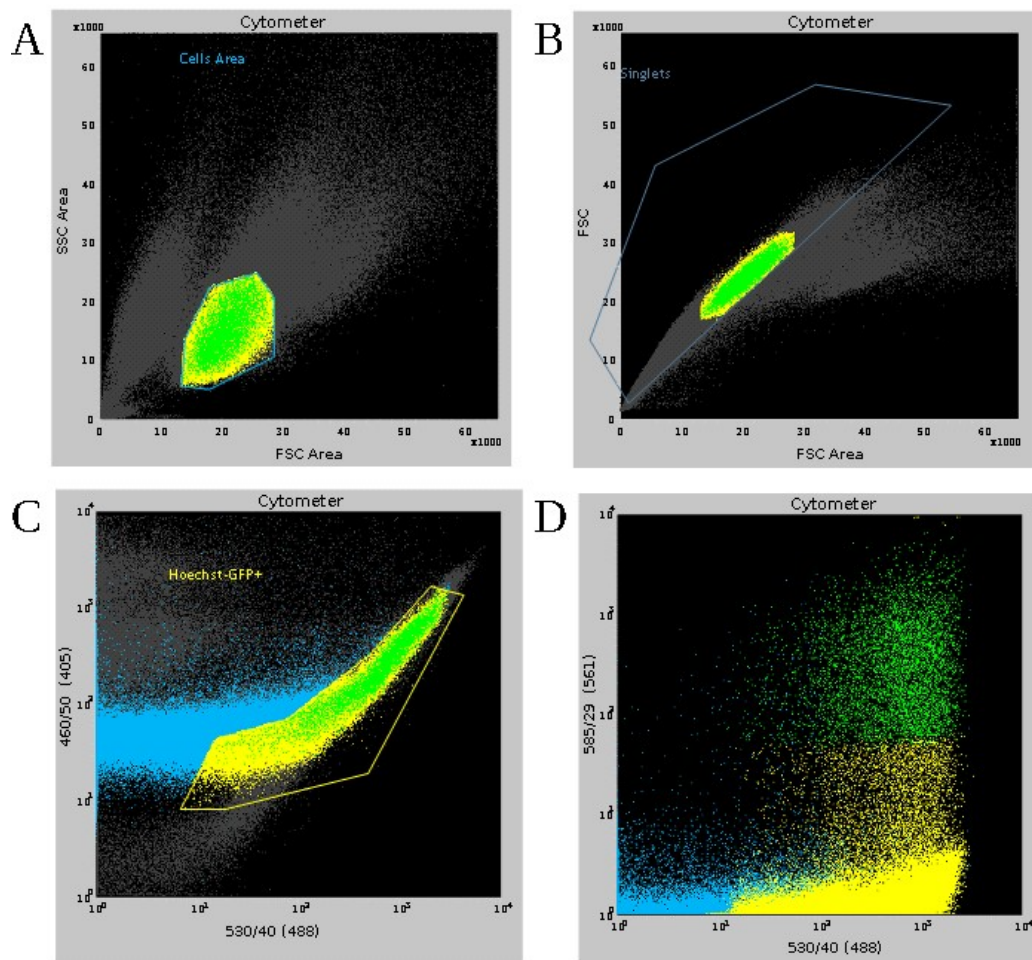


**Obrázek č. 5.3 Testování funkčnosti gRNA**

(A) Testování funkčnosti 5'gRNA. (B) Testování funkčnosti 3'gRNA. (C-F) Negativní kontroly, udávají schopnost plazmidu pAVR-prázdný podstoupit samovolně rekonstrukci sekvence pro RFP. Stejně tak jako kontrolují schopnost Cas9 z plazmidu pX330-prázdný bez gRNA způsobovat DSB.

## 5.5 Selektce buněk průtokovou cytometrií

Selektce HeLa buněk probíhala na základě schopnosti 3'gRNA vytvářet DSB a tím způsobit rekonstituci signálu pro RFP v plazmidu pAVR-3'B. Na Obrázku č. 5.4 můžeme pozorovat nastavení průtokového cytometru a parametry, podle kterých byly buňky selektovány. Pozitivní buňka musela: vykazovat signál pro jednobuněčnou suspenzi buněk, být negativní na signál pro barvivo Hoechst 33342 a zároveň být pozitivní na signál pro RFP a GFP.



**Obrázek č. 5.4** Nastavení průtokového cytometru při selekci HeLa buněk pozitivních na signál RFP

(A) Vyznačení oblasti, ze které budou sortovány HeLa buňky.

(B) Při přípravě buněk do suspenze k sortování, nebyly všechny buňky resuspendovány do jednobuněčné suspenze. Z tohoto důvodu bylo nutné vyznačit oblast, kde průtokový cytometr zaznamenává pouze buňky v singletním stavu.

(C) Na ose x se nachází signál pro GFP (emise 530 nm) a na ose y se nachází signál pro barvivo Hoechst 33342 (emise 405 nm). Vyznačená oblast obsahuje buňky se signálem pro GFP a nízkým signálem pro Hoechst 33342.

(D) Na ose x se opět nachází signál pro GFP a na ose y je vyobrazen signál pro RFP (emise 585 nm). Buňky, které byly sortovány, jsou na tomto obrázku označeny zeleně a mají signál jak pro GFP tak pro RFP.

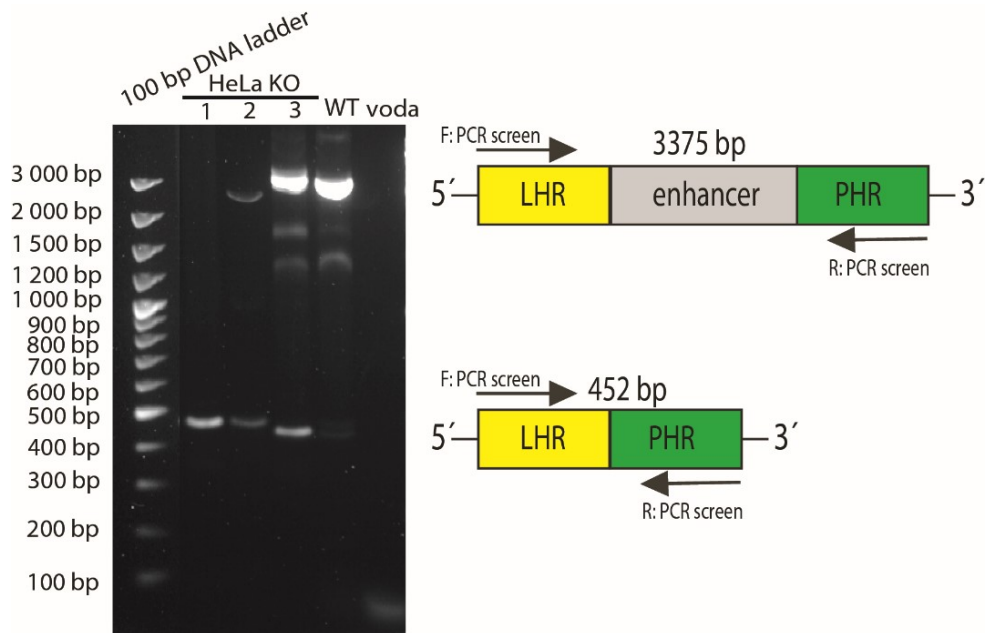
## 5.6 Identifikace HeLa KO linií

Ke zjištění, zdali v buňkách, které byly selektované v předchozí kapitole na signál pro RFP, skutečně došlo k delecí sekvence, která měla obsahovat predikovaný transkripční enhancer, byly provedeny dvě kola selekcí pomocí PCR. V prvním kole selekce byly použity primery zvané PCR screen, tyto primery asociovaly s DNA v těsné blízkosti deletované sekvence. Oba primery byly navrženy v sekvenci homologního templátu, který byl buňkám poskytnut ke zlepšení účinnosti opravy DSB (viz Obrázek č. 5.5). U druhého kola selekce byl forwardový primer navržen tak, aby se nacházel mimo sekvenci homologního templátu. Touto selekcí bylo možno zkontrolovat, že se homologní templát neinkorporoval náhodně do genomu HeLa buněk, ale skutečně v místě, kde došlo k DSB. Reverzní primer zůstal stejný jako v prvním kole selekce (viz Obrázek č. 5.6).

Jednotlivé selektované buňky byly napěstovány do buněčné kultury. Z ní byla izolována genomová DNA a byly provedeny selekce pomocí PCR. Ze všech selektovaných buněk se nám podařilo získat tři pozitivní klony. U všech HeLa KO linií došlo alespoň v určité míře k delecí sekvence pro predikovaný transkripční enhancer. Z druhého kola selekce pomocí PCR je pravděpodobné, že v HeLa buňkách se nacházejí celkem čtyři alely pro vybranou sekvenci. HeLa KO 1 se jeví jako homozygot. U HeLa KO 2 došlo pravděpodobně u dvou alel k úplné delecí sekvence a u dvou alel k delecí částečné. Linie HeLa KO 3 má jednu alelu deletovanou zcela, dvě alely jeví známky částečných delecí a jedna alela zřejmě zůstala nedotčena.

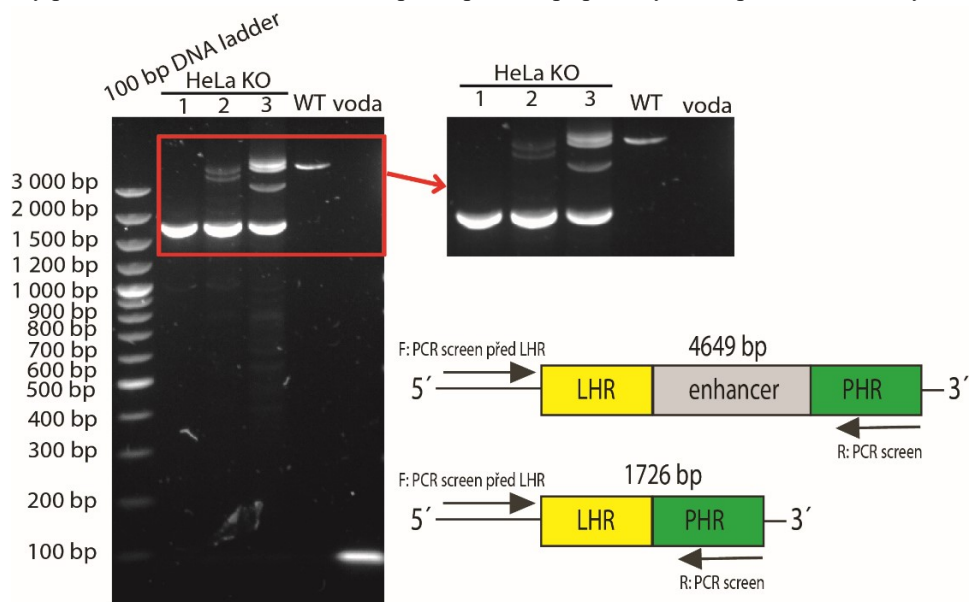
Dvěma koly selekce pomocí PCR se nám podařilo nalézt celkem tři HeLa KO linie. Linie označovaná jako HeLa KO 1 je homozygotní. Linie označované jako HeLa KO 2 a 3 jsou heterozygotní. S těmito připravenými liniemi jsme dále testovali alternativní sestřih exonu EDB genu *FNI* a úroveň transkripce tohoto genu.





**Obrázek č. 5.5 První kolo selekce pomocí PCR při hledání HeLa KO linií**

Buňky selektované na RFP signál, byly kultivovány do buněčné kultury. Z ní byla izolována gDNA a provedeno první kolo selekce. Na elektroforetogramu můžeme pozorovat nalezené tři pozitivní klony. Jsou označené jako HeLa KO 1, 2 a 3. Genomická DNA pro vzorek HeLa WT sloužila jako negativní kontrola. U vzorku označenému na elektroforetogramu jako voda, nebyla do směsi PCR přidána žádná DNA. Tento vzorek měl tak sloužit jako kontrola kontaminace směsi PCR cizorodou DNA. Vpravo je pak schématické zobrazení umístění primerů. LHR znamená levé homologní rameno a PHR je pravé homologní rameno, což jsou sekvence obklopující predikovaný transkripční enhancer. Při delecí tohoto predikovaného transkripčního enhanceru by produkt PCR měl velikost 452 bp. V opačném případě by délka produktu PCR byla 3375 bp.



**Obrázek č. 5.6 Druhé kolo selekce pomocí PCR při hledání HeLa KO linií**

Popis vzorků nacházejících se na tomto obrázku je totožný jako v případě Obrázku č. 5.5. V tomto kole selekce byl forwardový primer navržen mimo sekvenci LHR. Byla tak získána možnost zjistit, zdali nedošlo k náhodné inkorporaci homologního templátu do genomu HeLa buněk. Při delecí predikovaného transkripčního enhanceru by produkt PCR měl velikost 1 726 bp. V opačném případě by délka produktu PCR byla 4 649 bp.

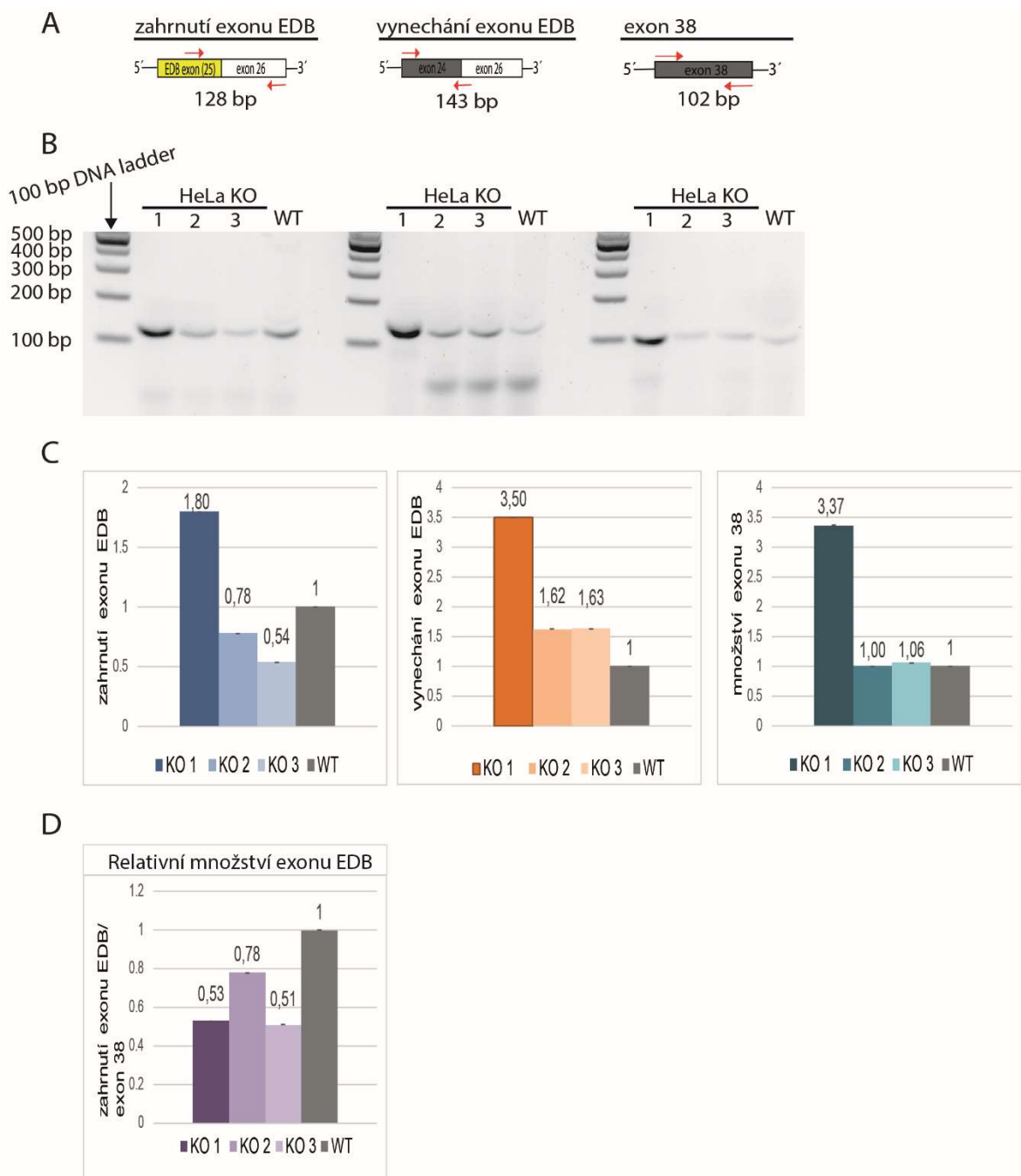
## 5.7 Semikvantitativní PCR pro detekci exonu EDB

Poté, co byly pomocí dvoukolové PCR selekce nalezeny HeLa KO linie, které obsahovaly v určité míře delecí sekvence pro predikovaný transkripční enhancer, bylo detekováno množství alternativního exonu EDB a množství transkripce genu *FNI* pomocí semikvantitativní PCR. Jelikož programy Regulatory Build a FANTOM 5 identifikovaly námi deletovanou oblast jako predikovaný transkripční enhancer, bylo očekáváno snížení transkripce genu *FNI*.

Pro semikvantitativní PCR byla použita cDNA připravená z HeLa KO linií, jako kontrola sloužila HeLa WT linie. Program pro semikvantitativní PCR měl 28 cyklů. Následně 5,0  $\mu$ l reakční směsi PCR bylo nanášeno na agarózovou elektroforézu. Na elektroforetogramu (viz Obrázek č. 5.7 B) byl pozorován rozdíl v alternativním sestřihu exonu EDB a i v úrovni transkripce genu *FNI*. Pomocí programu IMAGEJ bylo množství produktů PCR převedeno do grafů (viz Obrázek č. 5.7 C).

Oproti našemu očekávání transkripce genu *FNI* u homozygotní linie HeLa KO 1 rostla a u heterozygotních linií HeLa KO 2 a 3 zůstala stejná. Sekvence predikovaná jako transkripční enhancer, nebyl transkripční enhancer, ale transkripční represor. Alternativní sestřih exonu EDB byl v HeLa KO liniích taktéž pozměněn. Po normalizaci exonu EDB na konstitutivní exon 38, bylo pozorováno, že ve všech HeLa KO liniích došlo ke snížení zahrnutí exonu EDB do výsledné mRNA (viz obrázek č. 5.7 D).





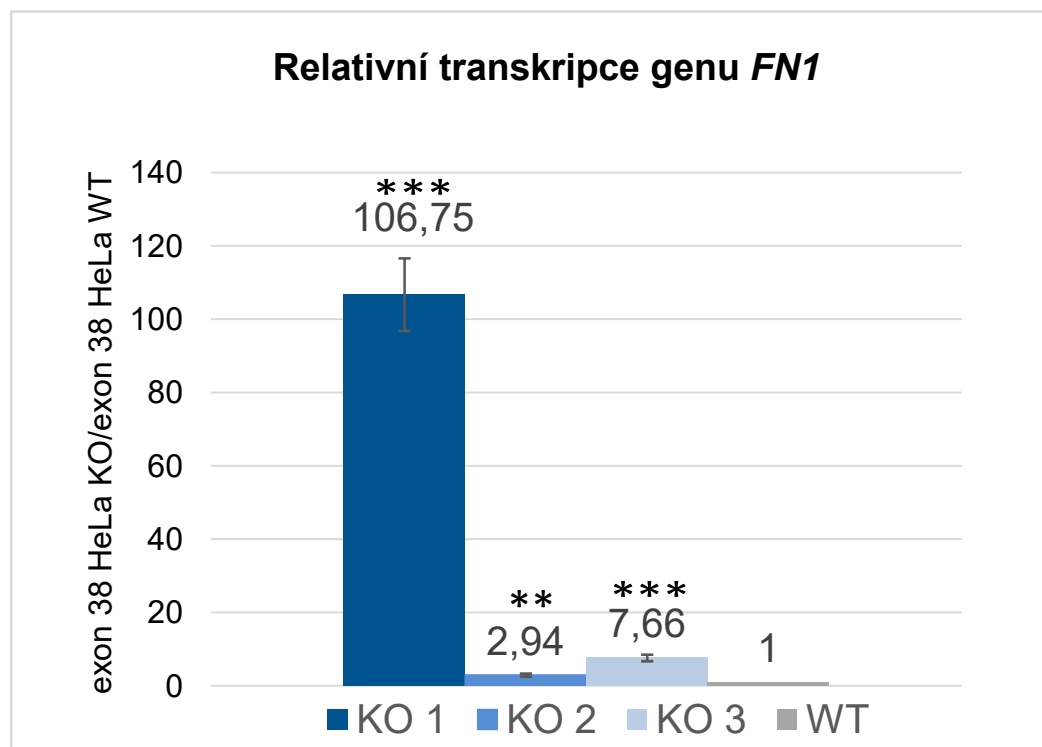
**Obrázek č. 5.7 Semikvantitativní PCR pro detekci alternativního exonu EDB**

(A) Schématické zobrazení umístění primerů na exonech genu *FNI* pro detekci míry zahrnutí či vynechání exonu EDB ve výsledné mRNA a pro detekci množství konstitutivního exonu 38. Pod exony s vyznačenými primery se nachází předpokládané velikosti produktů PCR. (B) Elektroforetogram produktů semikvantitativní PCR, po 28 cyklech. Jako templát byla použita cDNA připravená z HeLa KO linií a HeLa WT linie. (C) Množství produktů PCR z elektroforetogramu bylo změřeno pomocí programu IMAGEJ a převedeno do grafů. (D) Elektroforetogram detekující exon 38 ukazuje množství mRNA pro gen *FNI*. Vztažením zahrnutí exonu EDB na exon 38, dostáváme relativní množství exonu EDB. Můžeme tak porovnávat HeLa KO linie mezi sebou a vůči WT. Jak je patrné z grafu v sekci D, množství exonu EDB v HeLa KO liniích klesá. To naznačuje, že byl skutečně změněn alternativní sestřih.

## 5.8 Relativní transkripce genu *FN1*

Výsledky ze semikvantitativní PCR ukázaly, že predikovaný transkripční enhancer, byl ve skutečnosti transkripční represor. Abychom potvrdili tento výsledek, byly stejné data naměřeny pomocí RT-qPCR.

Transkripce genu *FN1* byla detekována pomocí konstitutivního exonu 38. Jako referenční gen byl použit gen *GAPDH*. Transkripce genu *FN1* HeLa KO linií byla vztažena na úroveň transkripce v HeLa WT linii. Bylo provedeno celkem osm nezávislých experimentů. Ve všech HeLa KO liniích transkripce genu *FN1* signifikantně rostla (viz Obrázek č. 5.8). Predikovaný transkripční enhancer byl tedy ve skutečnosti transkripční represor.



**Obrázek č. 5.8 HeLa KO linie vykazují vyšší transkripci genu *FN1***

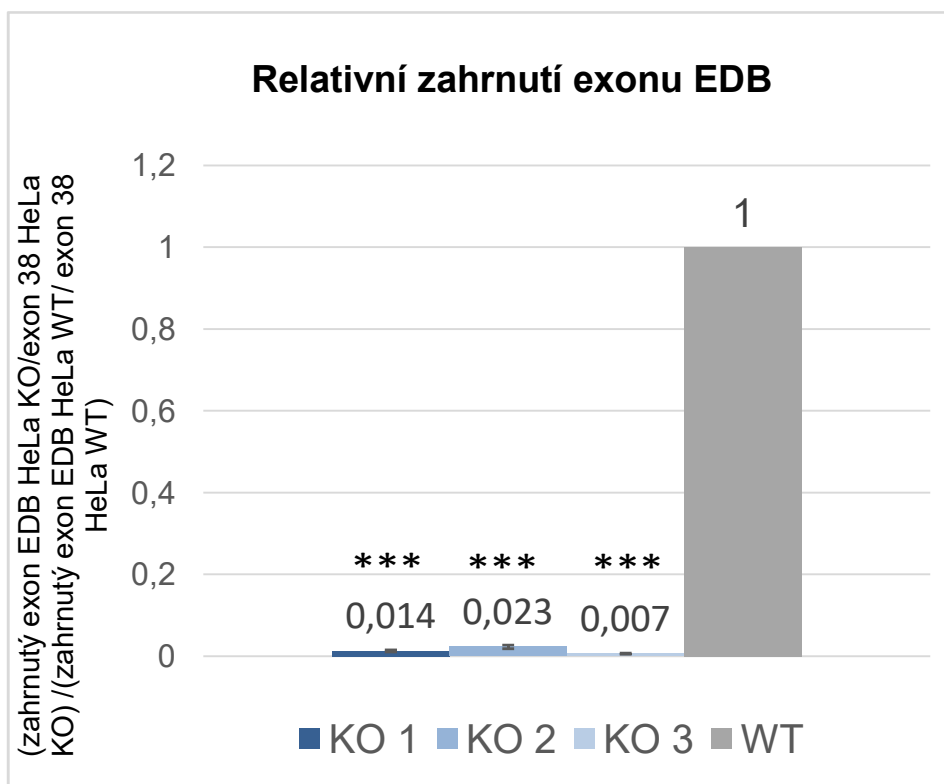
Data z RT-qPCR pro osm nezávislých experimentů byla normalizována k hodnotám získaným pro HeLa WT linii. Na obrázku jsou zobrazeny průměrné hodnoty transkripce společně s odchylkami od střední hodnoty průměru (SEM). Ve všech případech mezi HeLa KO liniemi a HeLa WT linií dochází ke signifikantnímu zvýšení transkripce genu *FN1*. Signifikance byla vypočtena použitím t-testu při porovnávání transkripce mezi HeLa KO liniemi a HeLa WT linií, \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

## 5.9 Alternativní sestřih exonu EDB u HeLa KO linií

Experimenty ze semikvantitativní PCR ukázaly, že po odstranění transkripčního represoru došlo ke snížení zahrnutí alternativního exonu EDB do výsledné mRNA pro *FNI*.

Míra zahrnutí exonu EDB do mRNA byla měřena pomocí RT-qPCR. Bylo provedeno celkem osm nezávislých experimentů. Množství exonu EDB bylo nejprve vztaženo na množství exonu 38 v rámci jedné KO linie a posléze bylo toto množství porovnáno s hodnotami pro HeLa WT linii.

Ve všech připravených HeLa KO liniích bylo oproti HeLa WT linii množství alternativního exonu EDB ve výsledné mRNA výrazně sníženo.



**Obrázek č. 5.9 Alternativní sestřih exonu EDB u HeLa KO linií**

Data z RT-qPCR pro HeLa KO linie z osmi nezávislých experimentů byla normalizována k hodnotám získaným pro HeLa WT linii. Na obrázku jsou zobrazeny průměrné hodnoty zahrnutí exonu EDB společně s SEM. Ve všech případech mezi HeLa KO liniemi a HeLa WT linií dochází ke signifikantnímu snížení zahrnutí exonu EDB do výsledné mRNA genu *FNI*. Signifikance byla vypočtena použitím t-testu při porovnávání míry zahrnutí exonu EDB mezi HeLa KO liniemi a HeLa WT linií, \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

## 6. DISKUZE

Alternativní sestřih je jedním ze základních procesů, který v lidských buňkách zajišťuje proteinovou komplexitu. Regulace tohoto procesu má mnoho úrovní. V naší laboratoři bylo ukázáno, že jedním typem regulace může být sekvence promotoru. Různé faktory asociující s promotorem mohou ovlivňovat alternativní sestřih skrz chromatinové modifikace (Dušková et al., 2014). Další studie naznačila, že transkripční enhancer SV40 může měnit alternativní sestřih exonu EDA skrz rozdílnou rychlost elongace RNA pol II (Kadener et al., 2002) (viz kapitola 1.4.4).

Obě studie navrhly, že regulační elementy DNA ať už v podobě promotoru či transkripčního enhanceru, mají schopnost regulovat alternativní sestřih. Tyto studie však byly prováděny na reportérových minigenech. Otázkou tedy zůstává, zda obdobný způsob regulace existuje i v endogenních podmínkách a jestli sekvence, které primárně regulují transkripci genu, mohou ovlivňovat i pre-mRNA sestřih. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli deletovat transkripční enhancer pro gen *FNI* v HeLa buňkách. K delecii byl použit CRISPR/Cas9 systém.

Jelikož pro gen *FNI* nebyl potvrzen žádný specifický transkripční enhancer, bylo nutné jej predikovat pomocí programů The Ensembl Regulatory Build a FANTOM 5 (viz kapitola 4.14). Oba programy identifikovaly v oblasti okolo 23,5 kbp před TSS pro gen *FNI* regulační oblast, kterou označily za pravděpodobný transkripční enhancer (viz kapitola 5.1) (The FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST (DGT), 2014); Zerbino et al., 2015). Predikce byla založena na výskytu specifických chromatinových modifikací a na senzitivitě k DNase I v 18 různých buněčných liniích, jejichž data byla volně přístupná v online databázích. Výsledek predikce je tedy průměrem dat z těchto buněčných linií. Jednotlivé buněčné linie se mezi sebou mohou značně lišit a stejná regulační oblast, může v rozdílných buněčných liniích zastávat i zcela odlišné funkce. Rozlišení mezi transkripčním enhancerem a represorem je při predikci velmi obtížné. V některých případech je totiž i transkripční aktivátor po asociaci s vhodnými kofaktory schopen fungovat jako represor (Perissi et al., 2004).

Proto jsme pomocí qPCR měřili transkripční aktivitu genu *FN1* (viz kapitola 5.8) po delecii sekvence tohoto predikovaného transkripčního enhanceru v HeLa buněčné linii. Ve všech připravených HeLa KO liniích transkripce genu *FNI* signifikantně vzrostla.

Tento výsledek ukazuje, že predikovaný regulační element funguje v HeLa buněčné linii jako transkripční represor.

Transkripční úroveň genu *FNI* se mezi jednotlivými liniemi HeLa KO značně liší. U buněčné linie HeLa KO 1 roste transkripce více než stokrát (106,7krát), u HeLa KO 2 byl zaznamenán přibližně trojnásobný nárůst (2,9krát) a u HeLa KO 3 vzrostla transkripce 7,7krát (viz kapitola 5.8). Úroveň transkripce genu *FNI* ukazuje jak silně transkripční represor na gen *FNI* působí, v souladu s tím, že jsme z linie HeLa KO 1 odstranili všechny alely transkripčního represoru, byl nejvyšší nárůst transkripce zaznamenán u této linie. U heterozygotních buněčných linií HeLa KO 2 a 3 došlo u některých alel jen k částečnému odstranění represoru. To může být způsobeno tím, že u těchto alel nedošlo k HDR, ale k NHEJ a jen k částečnému odstranění represorové sekvence, čímž si tyto alely mohly částečně zachovat schopnost reprimovat transkripci genu *FNI*.

Naproti tomu při zahrnutí alternativního exonu EDB do výsledné mRNA, nebyl mezi připravenými HeLa KO liniemi velký rozdíl. Ve všech připravených HeLa KO liniích byla úroveň zahrnutí alternativního exonu EDB nižší než u HeLa WT linie. Tento trend byl pozorován jak při použití semi-qPCR tak i qPCR (viz kapitoly 5.7 a 5.9). Jak je tedy možné, že HeLa KO linie, mají podobný alternativní sestřih, i když u nich byla zaznamenána rozdílná úroveň transkripce? Jedním z možných vysvětlení je, že alely genu *FNI*, u nichž byl deletován transkripční represor, se stávají transkripčně aktivnější a tvoří většinu mRNA genu *FNI*. Po delecii represoru je ovlivněn alternativní sestřih exonu EDB (např. rychlostí elongace RNA pol II či chromatinovými modifikacemi) a jelikož alely, u nichž byl tento represor deletován, tvoří většinu mRNA, byl u všech HeLa KO linií pozorován podobný efekt na alternativní sestřih.

Naše data naznačují, že distální regulační elementy DNA, v tomto případě transkripční represor, mohou ovlivňovat alternativní sestřih. V předchozích studiích bylo ukázáno, že složení proteinů asociujících s promotorem je schopno ovlivnit alternativní sestřih (Hnilicová et al., 2013). Dalším známým poznatkem je, že typ promotoru je také odpovědný za výsledek alternativního sestřihu (Kornblihtt, 2005). Distální regulační elementy DNA jsou *cis* elementy, jejichž společným rysem je schopnost tvořit lasovité struktury DNA (tzv. DNA looping) a dostávat se tak do těsné blízkosti promotorů a TSS daných genů (Vilar and Saiz, 2005). Komplex proteinů, který s těmito sekvencemi asociuje, tak může měnit vlastnosti promotoru a tím ovlivňovat alternativní sestřih nezávisle na úrovni transkripce.

Vyšší acetylace histonů v oblastech alternativních exonů má za následek lokální zvýšení rychlosti elongace RNA pol II, čímž je ovlivněn alternativní sestřih těchto exonů (Hnilicová et al., 2011). Úroveň transkripce nemá přímou spojitost s alternativním sestřihem, protože je závislá na počtu aktivních RNA pol II, nikoliv však na jejich rychlosti elongace. Se sekvencí transkripčních represorů je schopno asociovat značné množství proteinů, mezi nimi i například chromatin modifikující enzymy (Ogbourne and Antalis, 1998; Seager et al., 2001), které po asociaci komplexu transkripčního represoru s oblastí promotoru mohou způsobit změnu chromatinových modifikací v genu a tím změnu alternativního sestřihu. Po delecii transkripčního represoru bude chromatin modifikován jiným způsobem a dojde ke změně alternativního sestřihu.

Z dat uvedených v této práci vyplývá, že alternativní sestřih je velmi komplexní proces a jeho regulace má mnoho úrovní a podob. V této práci jsme ukázali, že dalším regulátorem alternativního sestřihu mohou být i distální regulační elementy, které byly doposud považovány pouze za regulátory transkripce.

## 7. ZÁVĚR

V předkládané diplomové práci byla predikována sekvence pro transkripční enhancer fibronektinového genu. Pomocí CRISPR/Cas9 systému byla tato sekvence odstraněna v HeLa buněčných liniích. Byla připravena jedna homozygotní HeLa KO buněčná linie a dvě heterozygotní HeLa KO buněčné linie.

Výsledky qPCR ukázaly, že ve všech HeLa KO liniích je transkripce signifikantně zvýšená. Predikovaná oblast nebyla tedy transkripčním enhancerem, ale transkripčním represorem.

Ve všech HeLa KO liniích bylo pomocí qPCR ukázáno, že alternativní exon EDB je oproti HeLa WT liniím častěji vynecháván z výsledné mRNA. Transkripční represor, který se nachází 23,5 kpb proti směru transkripce od TSS fibronektinového genu, je schopen ovlivnit alternativní sestřih exonu EDB.

Tyto výsledky ukazují, že vzdálené transkripční regulační elementy mohou mít vliv na alternativní sestřih.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ameur, A., Zaghlool, A., Halvardson, J., Wetterbom, A., Gyllensten, U., Cavelier, L., and Feuk, L. (2011). Total RNA sequencing reveals nascent transcription and widespread co-transcriptional splicing in the human brain. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 1435–1440.
- Andersson, R., Enroth, S., Rada-Iglesias, A., Wadelius, C., and Komorowski, J. (2009). Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. *Genome Research* 19, 1732–1741.
- Ankö, M. L., Morales, L., Henry, I., Beyer, A., and Neugebauer, K. M. (2010). Global analysis reveals SRp20- and SRp75-specific mRNPs in cycling and neural cells. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 962–970.
- Astrof, S., Crowley, D., and Hynes, R. O. (2007). Multiple cardiovascular defects caused by the absence of alternatively spliced segments of fibronectin. *Developmental Biology* 311, 11–24.
- Auboeuf, D., Höning, A., Berget, S. M., and O'Malley, B. W. (2002). Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* 298, 416–419.
- Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* 21, 381–395.
- Barash, Y., Calarco, J. A., Gao, W., Pan, Q., Wang, X., Shai, O., Blencowe, B. J., and Frey, B. J. (2010). Deciphering the splicing code. *Nature* 465, 53–59.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T. Y., Schones D. E., Wang Z., Wei G., Chepelev I., and Zhao K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823–837.
- Barth, T. K., and Imhof, A. (2010). Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 618–626.
- Berget, S. M., Moore, C., and Sharp, P. A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74, 3171–3175.
- Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C. L., Urlaub, H., and Lührmann, R. (2008). Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* 452, 846–850.
- Beyer, A. L., and Osheim, Y. N. (1988). Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes Development* 2, 754–765.
- Bieberstein, N. I., Carrillo Oesterreich, F., Straube, K., and Neugebauer, K. M. (2012). First exon length controls active chromatin signatures and transcription. *Cell Reports* 2, 62–68.



- Boireau, S., Maiuri, P., Basyuk, E., de la Mata, M., Knezevich, A., Pradet-Balade, B., Bäcker, V., Kornblihtt, A., Marcello, A., and Bertrand, E. (2007). The transcriptional cycle of HIV-1 in real-time and live cells. *Journal of Cell Biology* *179*, 291–304.
- Boise, L. H., González-García, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L. A., Mao, X., Nuñez, G., and Thompson, C. B. (1993). *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* *74*, 597–608.
- Carrillo Oesterreich, F., Preibisch, S., and Neugebauer, K. M. (2010). Global analysis of nascent RNA reveals transcriptional pausing in terminal exons. *Molecular and Cellular Biology* *40*, 571–581.
- Cech, T. R. (1986). The generality of self-splicing RNA: Relationship to nuclear mRNA splicing. *Cell* *44*, 207–210.
- Cech, T. R. (1990). Nobel lecture. Self-splicing and enzymatic activity of an intervening sequence RNA from *Tetrahymena*. *Bioscience Reports* *10*, 239–261.
- Cmarko, D., Verschure, P. J., Martin, T. E., Dahmus, M. E., Krause, S., Fu, X. D., van Driel, R., and Fakan, S. (1999). Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. *Molecular Biology of the Cell* *10*, 211–223.
- Collins, L., and Penny, D. (2005). Complex Spliceosomal organization ancestral to extant eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* *22*, 1053–1066.
- Cooper, T. A., Wan, L., and Dreyfuss, G. (2009). RNA and disease. *Cell* *136*, 777–793.
- Cordin, O., Hahn, D., and Beggs, J. D. (2012). Structure, function and regulation of spliceosomal RNA helicases. *Current Opinion in Cell Biology* *24*, 431–438.
- Cramer, P., Cáceres, J. F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, A. F., Baralle, F. E., and Kornblihtt, A. R. (1999). Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Molecular and Cellular Biology* *4*, 251–258.
- De la Mata, M., and Kornblihtt, A. R. (2006). RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nature Structural & Molecular Biology* *13*, 973–980.
- De la Mata, M., Alonso, C. R., Kadener, S., Fededa, J. P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., and Kornblihtt, A. R. (2003). A slow RNA polymerase II affects alternative splicing in vivo. *Molecular Cell* *12*, 525–532.
- Du, H., and Rosbash, M. (2002). The U1 snRNP protein U1C recognizes the 5' splice site in the absence of base pairing. *Nature* *419*, 86–90.
- Dušková, E., Hnilicová, J., and Staněk, D. (2014). CRE promoter sites modulate alternative splicing via p300-mediated histone acetylation. *RNA Biology* *11*, 865–874.
- Engel, J. (1991). Common structural motifs in proteins of the extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology* *3*, 779–785.

- Ffrench-Constant Ch. (1995). Alternative Splicing of Fibronectin-Many Different Proteins but Few Different Functions. *Experimental Cell Research* 221, 261–271.
- Fica, S. M., Tuttle, N., Novak, T., Li, N. S., Lu, J., Koodathingal, P., Dai, Q., Staley, J. P., and Piccirilli, J. A. (2013). RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing. *Nature* 503, 229–234.
- Forrest, A. R. R., Kawaji, H., Rehli, M., Baillie, J. K., Hoon, M. J. L. de, Haberle, V., Lassmann, T., Kulakovskiy, I. V., Lizio, M., et al. (2014). A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature* 507, 462–470.
- George, E. L., Georges-Labouesse, E. N., Patel-King, R. S., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* 119, 1079–1091.
- Girard, C., Will, C. L., Peng, J., Makarov, E. M., Kastner, B., Lemm, I., Urlaub, H., Hartmuth, K., and Lührmann, R. (2012). Post-transcriptional spliceosomes are retained in nuclear speckles until splicing completion. *Nature Communication* 3, 994-1002.
- Görnemann, J., Kotovic, K. M., Hujer, K., and Neugebauer, K. M. (2005). Cotranscriptional spliceosome assembly occurs in a stepwise fashion and requires the cap binding complex. *Molecular and Cellular Biology* 19, 53–63.
- Görnemann, J., Barrandon, C., Hujer, K., Rutz, B., Rigaut, G., Kotovic, K. M., Faux, C., Neugebauer, K. M., and Séraphin, B. (2011). Cotranscriptional spliceosome assembly and splicing are independent of the Prp40p WW domain. *RNA* 17, 2119–2129.
- Graveley, B. R., and Maniatis, T. (1998). Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing. *Molecular and Cellular Biology* 1, 765–771.
- Grinnell, F., Billingham, R. E., and Burgess, L. (1981). Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *Journal of Investigative Dermatology* 76, 181–189.
- Hang, J., Wan, R., Yan, C., and Shi, Y. (2015). Structural basis of pre-mRNA splicing. *Science* 349, 1191–1198.
- Hinterberger, M., Pettersson, I., and Steitz, J. A. (1983). Isolation of small nuclear ribonucleoproteins containing U1, U2, U4, U5, and U6 RNAs. *Journal of Biochemical Chemistry* 258, 2604–2613.
- Hnilicová, J., and Staněk, D. (2011). Where splicing joins chromatin. *Nucleus* 2, 182–188.
- Hnilicová, J., Hozeifí, S., Dušková, E., Icha, J., Tománková, T., and Staněk, D. (2011). Histone Deacetylase Activity Modulates Alternative Splicing. *PLoS One* 6, 137-143.
- Hnilicová, J., Hozeifí, S., Stejskalová, E., Dušková, E., Poser, I., Humpolíčková, J., Hof, M., and Staněk, D. (2013). The C-terminal domain of Brd2 is important for chromatin interaction and regulation of transcription and alternative splicing. *Molecular Biology of the Cell* 24, 3557–3568.

- Huranová, M., Hnilicová, J., Fleischer, B., Cvacková, Z., and Stanek, D. (2009). A mutation linked to retinitis pigmentosa in HPRP31 causes protein instability and impairs its interactions with spliceosomal snRNPs. *Human Molecular Genetics* 18, 2014–2023.
- Huranová, M., Ivani, I., Benda, A., Poser, I., Brody, Y., Hof, M., Shav-Tal, Y., Neugebauer, K. M., and Stanek, D. (2010). The differential interaction of snRNPs with pre-mRNA reveals splicing kinetics in living cells. *Journal of Cell Biology* 191, 75–86.
- Chauhan, A. K., Kisucka, J., Cozzi, M. R., Walsh, M. T., Moretti, F. A., Battiston, M., Mazzucato, M., De Marco, L., Baralle, F. E., Wagner, D. D., et al. (2008). Prothrombotic effects of fibronectin isoforms containing the EDA domain. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, 296–301.
- Chow, L. T., Gelinas, R. E., Broker, T. R., and Roberts, R. J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12, 1–8.
- Jiang, F., and Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and mechanisms. *Annual Review of Biophysics* 46, 505–529.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.
- Jurica, M. S., and Moore, M.J. (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular Cell* 12, 5–14.
- Kadener, S., Fededa, J. P., Rosbash, M., and Kornblihtt, A. R. (2002). Regulation of alternative splicing by a transcriptional enhancer through RNA pol II elongation. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99, 8185–8190.
- Khodor, Y. L., Rodriguez, J., Abruzzi, K. C., Tang, C. H. A., Marr, M. T., and Rosbash, M. (2011). Nascent-seq indicates widespread cotranscriptional pre-mRNA splicing in *Drosophila*. *Genes Development* 25, 2502–2512.
- Konarska, M. M., Vilardell, J., and Query, C. C. (2006). Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. *Molecular Biology of the Cell* 21, 543–553.
- Konkel, D. A., Tilghman, S. M., and Leder, P. (1978). The sequence of the chromosomal mouse  $\beta$ -globin major gene: Homologies in capping, splicing and poly(A) sites. *Cell* 15, 1125–1132.
- Kornblihtt, A. R. (2005). Promoter usage and alternative splicing. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 262–268.
- Kornblihtt, A. R., Vibe-Pedersen, K., and Baralle, F. E. (1984). Human fibronectin: molecular cloning evidence for two mRNA species differing by an internal segment coding for a structural domain. *EMBO Journal* 3, 221–226.
- Lambowitz, A. M., and Zimmerly, S. (2011). Group II Introns: Mobile Ribozymes that Invade DNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, 224–235

- Lerner, M. R., and Steitz, J. A. (1979). Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 76, 5495-5501.
- Lerner, M. R., Boyle, J. A., Mount, S. M., Wolin, S. L., and Steitz, J. A. (1980). Are snRNPs involved in splicing? *Nature* 283, 220–224.
- Lim, L. P., and Sharp, P. A. (1998). Alternative splicing of the fibronectin EIIIB exon depends on specific TGCATG repeats. *Molecular and Cell Biology* 18, 3900–3906.
- Ma Y., Zhang L., and Huang X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *The FEBS Journal* 281, 5186–5193.
- Magnusson, M. K., and Mosher, D. F. (1998). Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18, 1363–1370.
- Matera, A. G., and Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 108–121.
- Matlin, A. J., Clark, F., and Smith, C. W. J. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 386–398.
- Nieto Moreno, N., Giono, L. E., Cambindo Botto, A. E., Muñoz, M. J., and Kornblihtt, A. R. (2015). Chromatin, DNA structure and alternative splicing. *FEBS Letters* 589, 3370–3378.
- Norton, P. A., and Hynes, R. O. (1993). Characterization of HeLa nuclear factors which interact with a conditionally processed rat fibronectin pre-mRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 195, 215–221.
- Ogbourne, S., and Antalis, T. M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochemical Journal* 331, 1–14.
- Patel, A. A., and Steitz, J. A. (2003). Splicing double: insights from the second spliceosome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 960–970.
- Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C. K., Rose, D. W., and Rosenfeld, M. G. (2004). A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors. *Cell* 116, 511–526.
- Raghunathan, P. L., and Guthrie, C. (1998). RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Current Biology* 8, 847–855.
- Ramani, A. K., Calarco, J. A., Pan, Q., Mavandadi, S., Wang, Y., Nelson, A. C., Lee, L. J., Morris, Q., Blencowe, B. J., Zhen, M. (2011). Genome-wide analysis of alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Research* 21, 342–348.
- Sims, R. J. (2007). Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription post-initiation factors and pre-mRNA Splicing. *Molecular Cell* 28, 665-672.

- Saint-André, V., Batsché, E., Rachez, C., and Muchardt, C. (2011). Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1 $\gamma$  favor inclusion of alternative exons. *Nature Structural & Molecular Biology* *18*, 337–344.
- Sapra, A. K., Ankö, M. L., Grishina, I., Lorenz, M., Pabis, M., Poser, I., Rollins, J., Weiland, E. M., and Neugebauer, K. M. (2009). SR protein family members display diverse activities in the formation of nascent and mature mRNPs in vivo. *Molecular and Cell Biology* *34*, 179–190.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T., and Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. *Journal of Experimental Medicine* *97*, 695–710.
- Scherer, S. (2009). *A short guide to the human genome*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schor, I. E., Rascovan, N., Pelisch, F., Alló, M., and Kornblihtt, A. R. (2009). Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proceedings of the National Academy of Science USA* *106*, 4325–4330.
- Seager, J. H., Stevens, B. A., McCaffery, I., and Hames, B. D. (2001). Identification of novel elements which regulate the cell-type specificity of Dictyostelium 7E gene expression. *Differentiation* *68*, 22–30.
- Sharma, S., Falick, A. M., and Black, D. L. (2005). Polypyrimidine tract binding protein blocks the 5' splice site-dependent assembly of U2AF and the prespliceosomal E complex. *Molecular and Cell Biology* *19*, 485–496.
- Staley, J. P., and Woolford, J. L. (2009). Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines. *Current Opinion in Cell Biology* *21*, 109–118.
- Sun, J. S., and Manley, J. L. (1995). A novel U2-U6 snRNA structure is necessary for mammalian mRNA splicing. *Genes Development* *9*, 843–854.
- Tardiff, D. F., and Rosbash, M. (2006). Arrested yeast splicing complexes indicate stepwise snRNP recruitment during in vivo spliceosome assembly. *RNA* *12*, 968–979.
- Tilgner, H., Nikolaou, C., Althammer, S., Sammeth, M., Beato, M., Valcárcel, J., and Guigó, R. (2009). Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nature Structural & Molecular Biology* *16*, 996–1001.
- Tourasse, N. J., Stabell, F. B., and Kolstø, A. B. (2010). Structural and functional evolution of group II intron ribozymes: insights from unusual elements carrying a 3' extension. *Nature Biotechnology* *27*, 204–211.
- Tseng, C. K., and Cheng, S. C. (2008). Both catalytic steps of nuclear pre-mRNA splicing are reversible. *Science* *320*, 1782–1784.
- Ule, J., Stefani, G., Mele, A., Ruggiu, M., Wang, X., Taneri, B., Gaasterland, T., Blencowe, B. J., and Darnell, R. B. (2006). An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature* *444*, 580–586.

- Vanáčová, S., Yan, W., Carlton, J. M., and Johnson, P. J. (2005). Spliceosomal introns in the deep-branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* *102*, 4430–4435.
- Vilar, J. M. G., and Saiz, L. (2005). DNA looping in gene regulation: from the assembly of macromolecular complexes to the control of transcriptional noise. *Current Opinion in Genetics & Development* *15*, 136–144.
- Wahl, M. C., Will, C. L., and Lührmann, R. (2009). The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* *136*, 701–718.
- White, E. S., and Muro, A. F. (2011). Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. *Biochemistry and Molecular Biology International* *63*, 538–546.
- White, E. S., Sagana, R. L., Booth, A. J., Yan, M., Cornett, A. M., Bloomheart, C. A., Tsui, J. L., Wilke, C. A., Moore, B. B., Ritzenthaler, J. D., et al. (2010). Control of fibroblast fibronectin expression and alternative splicing via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Experimental Cell Research* *316*, 2644–2653.
- Will, C. L., and Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *3*, 7-24.
- Williams, C. M., Engler, A. J., Slone, R. D., Galante, L. L., and Schwarzbauer, J. E. (2008). Fibronectin expression modulates mammary epithelial cell proliferation during acinar differentiation. *Cancer Research* *68*, 3185–3192.
- Zerbino, D. R., Wilder, S. P., Johnson, N., Juettemann, T., and Flicek, P. R. (2015). The Ensembl Regulatory Build. *Genome Biology* *16*, 56-64.

