

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