

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

На правах рукописи

Переверзев Антон Петрович

**Методы анализа процессинга и деградации мРНК с помощью  
флуоресцентных белков**

специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель:**  
Доктор биологических наук  
Лукьянов Константин Анатольевич

Москва 2014

# ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ .....</b>	<b>2</b>
<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>4</b>
<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>6</b>
1.1 Процессинг и деградация мРНК в клетках млекопитающих.....	6
1.1.1 Альтернативный сплайсинг.....	6
1.1.2 Нонсенс-зависимая деградация мРНК .....	7
1.2 Функциональная организация процесса NMD .....	8
1.2.1 Участвующие в процессе NMD белки .....	8
1.2.2 Механизм распознавания стоп-кодонов как ПСК.....	13
1.2.3 Регуляция активности NMD.....	16
1.3 Физиологическое значение процесса NMD, а также отдельных факторов NMD в норме и патологии .....	17
1.3.1 Регуляция представленности мРНК селенопротеинов .....	18
1.3.2 NMD и ответ клеток на стресс .....	18
1.3.3 Регуляция представленности транскриптов, возникающих путем альтернативного сплайсинга.....	19
1.3.4 NMD и перестройки генов антител .....	21
1.3.5 Участие отдельных факторов NMD в различных процессах физиологии клетки .....	22
1.3.6 NMD и фенотипическое проявление генетических заболеваний .....	23
1.4 Существующие подходы для исследования процессинга и деградации мРНК.....	31
1.4.1 Основные методы, применяемые для исследования процесса сплайсинга .....	31
1.4.2 Основные методы, применяемые для исследования процесса NMD.....	32
<b>ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ .....</b>	<b>35</b>
<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>36</b>
2.1 Материалы .....	36
2.1.1 Вектора.....	36
2.1.2 Реактивы и расходные материалы для клонирования .....	36
2.1.3 Оборудование и программное обеспечение для клонирования.....	37
2.1.4 Эукариотические клеточные линии, культуральные среды и расходные материалы .....	37
2.1.5 Оборудование для работы с клеточными линиями и анализа флуоресцентных сигналов.....	38
2.1.6 Реагенты и оборудование для Вестерн-блоттинга .....	38
2.1.7 Реагенты и оборудование для выделения РНК, синтеза кДНК и количественной ПЦР .....	39
2.2 Методы.....	40

2.2.1	Получение генетических конструкций .....	40
2.2.2	Культивирование и трансфекция клеточных линий НЕК и HeLa .....	44
2.2.3	Культивирование и трансфекция первичных клеток MEF и ES .....	44
2.2.4	Флуоресцентная микроскопия .....	45
2.2.5	Проточная цитометрия .....	46
2.2.6	Вестерн-блоттинг .....	46
2.2.7	Нокаут эндогенного UPF1 с помощью кшРНК в культуре клеток.....	47
2.2.8	Выделение РНК, получение кДНК и количественная ОТ-ПЦР в реальном времени .....	48
2.2.9	Обработка клеточных линий известными ингибиторами NMD и оценка стабильности РНК сенсора.....	50
2.2.10	Работа с трансгенными эмбрионами <i>Xenopus laevis</i> .....	51
<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>		<b>53</b>
3.1	Использование пары флуоресцентных белков TagGFP2 и Katushka для мониторинга процессинга РНК <i>in vivo</i> .....	53
3.2	Разработка генетически кодируемых репортеров активности NMD .....	58
3.2.1	Разработка генетически кодируемого репортера активности опосредуемого сплайсингом NMD .....	58
3.2.2	Разработка генетически кодируемого репортера активности независимого от сплайсинга NMD .....	62
3.3	NMD в культуре клеток.....	64
3.3.1	Выбор контрольной репортерной конструкции для зависимого от сплайсинга NMD.....	64
3.3.2	Тестирование репортера для зависимого от сплайсинга NMD в линии клеток млекопитающих.....	65
3.3.3	Оценка способности разработанного репортера зависимого от сплайсинга NMD отслеживать изменения активности NMD в клетках НЕК293Т .....	70
3.3.4	Применение разработанного репортера для измерения активности зависимого от сплайсинга NMD в различных линиях клеток .....	76
3.3.5	Тестирование репортера для независимого от сплайсинга NMD в линии клеток млекопитающих.....	79
3.4	Оценка возможности применения разработанного репортера активности опосредуемого сплайсингом NMD в трансгенных животных на примере эмбрионов шпорцевых лягушек <i>Xenopus laevis</i> .....	81
3.5	Применение интрона 2 гена $\beta$ -глобина человека для усиления экспрессии химерных генов.....	84
<b>ВЫВОДЫ .....</b>		<b>86</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>		<b>87</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>		<b>89</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>		<b>91</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Практически каждый этап метаболизма мРНК подвержен специфической регуляции, что обеспечивает сложный пост-транскрипционный контроль экспрессии эукариотических генов. Для установления полной картины регуляции экспрессии транскриптов необходимо исследовать механизмы, регулирующие все этапы метаболизма мРНК от ее синтеза и сплайсинга до транспорта из ядра и деградации в цитоплазме. Одними из самых важных аспектов метаболизма мРНК являются ее сплайсинг и деградация.

Механизмы процессинга и деградации мРНК играют важную роль в усложнении и регулировании транскриптома и поэтому сами подвержены сложному механизму регулирования. Паттерны альтернативного сплайсинга и активность NMD регулируются в зависимости от типа клеток, их функционального состояния и экзогенных стимулов. Функционируя вместе, альтернативный сплайсинг и нонсенс-зависимая деградация мРНК через механизм RUST опосредуют регуляцию ряда семейств белков, вовлеченных в процессинг мРНК.

Альтернативный сплайсинг играет главную роль в увеличении сложности протеома и регулирует экспрессию генов. Регуляция альтернативного сплайсинга является сложным процессом, который до сих пор до конца не изучен. Было показано, что в регуляции альтернативного сплайсинга участвуют короткие цис-действующие последовательности, но в этот процесс также могут быть вовлечены другие структурные особенности транскриптов, такие как вторичные структуры РНК.

Нонсенс-зависимая деградация (NMD) мРНК является консервативным механизмом разрушения транскриптов с преждевременными стоп-кодонами. NMD устраняет aberrantные мРНК, являющиеся результатами мутаций, альтернативного сплайсинга или перестроек ДНК в иммунных клетках. Главной функцией NMD является недопущение синтеза укороченных с С-конца, потенциально токсичных для клеток белков. Кроме того, как было недавно показано, мишенями этого процесса являются нормальные эндогенные транскрипты, которые несут стоп-кодона, которые распознаются как преждевременные.

Недавние исследования показали, активность NMD регулируется под действием различных механизмов, включая специфические микроРНК и концентрацию кальция. Таким образом, NMD функционирует как механизм регуляции экспрессии множества

генов в таких фундаментальных биологических процессах как эмбриональное развитие, дифференцировка клеток, канцерогенез и выживание клеток в условиях стресса. В частности, недавно было показано, что активность NMD регулируется специфической микроРНК, miR-128, которая ингибирует NMD за счет подавления экспрессии его ключевых факторов. Экспрессия miR-128 у позвоночных является тканеспецифической и происходит на строго определенных стадиях эмбрионального развития; miR-128 высоко консервативна и играет важную роль в нейрогенезе и развитии мозга.

Также было показано, что изменения альтернативного сплайсинга и NMD вовлечены в патогенез ряда заболеваний у человека.

Дальнейшее изучение роли NMD и альтернативного сплайсинга в таких физиологических феноменах как эмбриональное развитие, канцерогенез, гетерогенность клеточных популяций и ответ на клеточный стресс в сложных биологических системах требует разработки новых инструментов для исследования, в частности, эффективных репортерных систем, позволяющих количественно и быстро оценивать изменение активности NMD и паттернов альтернативного сплайсинга на уровне отдельных клеток и в динамике.

Репортерные конструкции на основе флуоресцентных белков обладают рядом известных преимуществ, таких как неинвазивность исследования, возможность отслеживать изменения в динамике, возможность отслеживать события на уровне отдельных клеток с помощью флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии, а также возможность их применения для высокопроизводительных функциональных скринингов по флуоресценции.

Существующие методики оценки нонсенс-зависимой деградации мРНК и альтернативного сплайсинга не позволяют количественно оценивать эти процессы на уровне отдельных клеток.

В свете вышеизложенного актуальной задачей видится разработка методов оценки процесса нонсенс-зависимой деградации мРНК и альтернативного сплайсинга на уровне отдельных клеток с помощью флуоресцентных белков.

# ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Процессинг и деградация мРНК в клетках млекопитающих

### 1.1.1 Альтернативный сплайсинг

Кодирующие белки эукариотические гены включают экзоны и интроны, и их первичные транскрипты претерпевают сплайсинг — вырезание интронов из пре-мРНК для образования зрелой мРНК, состоящей только из экзонов. Большая часть генов высших эукариот дает множество изоформ зрелых мРНК из-за альтернативного сплайсинга, в ходе которого экзоны могут быть сплайсированы и соединены различным образом [1]. Альтернативный сплайсинг представляет собой механизм увеличения сложности протеома и регуляции экспрессии генов в зависимости от различных типов ткани, стадий развития и экзогенных сигналов [2]. Альтернативный сплайсинг экспоненциально увеличивает количество белков, экспрессируемых с ограниченного набора генов [3]. Регуляция на уровне альтернативного сплайсинга дополнительно усложняет пост-транскрипционную регуляцию экспрессии генов.

До 59% человеческих генов дает множество мРНК за счет альтернативного сплайсинга [4], и в ~80% случаев альтернативный сплайсинг приводит к изменениям кодируемого белка [5]. В результате альтернативного сплайсинга в кодирующей последовательности белка могут быть вставлены или удалены последовательности аминокислот, может произойти сдвиг рамки считывания или может появиться стоп-кодон. Альтернативный сплайсинг также может повлиять на экспрессию генов за счет удаления или вставки в последовательность транскрипта регуляторных элементов, контролирующих трансляцию, стабильность РНК или ее локализацию.

Регуляция альтернативного сплайсинга является сложным процессом, который до сих пор до конца не изучен. Было показано, что в регуляцию альтернативного сплайсинга вовлечены короткие цис-действующие последовательности, называемые экзонными энхансерами сплайсинга (ESE) и сайленсерами сплайсинга (ESS) или интронными энхансерами сплайсинга и сайленсерами сплайсинга, которые расположены в альтернативных экзонах и близлежащих интронах, а также соседних конститутивных экзонах [1,6]. В регуляцию альтернативного сплайсинга также могут быть вовлечены другие структурные особенности транскриптов, такие как вторичная структура РНК и длина экзонов.

В последнее время появляются указания на значимую роль изменений альтернативного сплайсинга при различных заболеваниях человека [7,8].

Во многих случаях некоторые из продуктов альтернативного сплайсинга вследствие сдвига рамки считывания или удержания интрона включают преждевременные стоп-кодоны (ПСК), что ведет к разрушению транскрипта под действием механизма нонсенс-зависимой деградации мРНК (NMD). По некоторым оценкам, одна треть всех альтернативных транскриптов содержит ПСК и является мишенями для NMD [9].

### **1.1.2 Нонсенс-зависимая деградация мРНК**

Матричная РНК осуществляет перенос генетической информации из ядра в цитоплазму, где она служит матрицей для синтеза белков. После выхода мРНК из ядра в цитоплазму она может быть транслирована, отложена для поздней трансляции или разрушена [10]. мРНК, которые первоначально были транслированы, в дальнейшем могут быть подвержены временной репрессии трансляции. Все мРНК, в конце концов, разрушаются с определенной скоростью. В клетке мРНК связана с множеством белковых факторов, которые могут регулировать ее трансляцию, внутриклеточную локализацию и распад, некоторые из которых являются стабильно связанными с ней, в то время как другие подвержены динамическому обмену [11]. Индивидуальные компоненты комплексов мРНК-белок могут служить в качестве адаптеров, которые позволяют мРНК взаимодействовать с комплексами, опосредующими ее внутриклеточную локализацию, трансляцию и распад. Таким образом, ремоделирование комплексов мРНК-белок вероятно, играет важную роль в формировании решения о том, следует ли транслировать или деградировать мРНК.

Одним из регуляторных механизмов, который управляет распадом мРНК, является нонсенс-зависимый распад мРНК (NMD), механизм «оценки качества» РНК, который быстро разрушает молекулы мРНК, несущие преждевременные стоп-кодоны (ПСК). Ремоделирование комплексов мРНК-белок, как считается, имеет решающее значение для NMD [12–16].

Благодаря процессу нонсенс-зависимой деградации мРНК (NMD), в ходе которого происходит разрушение мРНК, несущих преждевременный стоп-кодон (ПСК), удаляются мРНК, которые могут привести к синтезу укороченных с С-конца белков. Такие белки могут обладать измененными биохимическими свойствами, что может проявиться в фенотипе как доминантный негативный признак [17].

NMD представляет собой консервативный механизм, обнаруженный в *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, млекопитающих и растениях.

ПСК образуются в молекулах мРНК в результате ошибок транскрипции и сплайсинга пре-мРНК. По современным оценкам, приблизительно 60 - 70 % пре-мРНК человека подвергаются альтернативному сплайсингу, из них, по некоторым данным, 45 % приводят к продуктам сплайсинга, которые являются мишенями для NMD [9]. NMD широко используется при редактировании пре-мРНК, возникающих в клетке при перестройке генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов, которая в двух третях случаев приводит к сдвигу рамки считывания и образованию ПСК [18].

Было обнаружено, что в дополнение к роли устранения транскриптов с нонсенс-мутациями NMD также может регулировать экспрессию множества физиологических мРНК, вовлеченных в различные клеточные процессы, такие как дифференцировка гемопоэтических стволовых клеток, ответ на стресс или поддержание структуры и функционирования хромосом [19–21]. Эти исследования указывают на роль NMD в пост-транскрипционной регуляции экспрессии генов наряду с «контролем качества» мРНК. Кроме того, медицинская и биологическая значимость пути NMD подтверждается исследованиями, показавшими, что устойчивость некоторых мишеней к NMD может приводить к тяжелым клиническим последствиям. [22,23].

## **1.2 Функциональная организация процесса NMD**

### **1.2.1 Участвующие в процессе NMD белки**

Необходимые для осуществления процесса NMD белки UPF1, UPF2 и UPF3 (SMG2, SMG3 и SMG4 у *C. elegans*) были обнаружены у дрожжей, позже их гомологи были найдены у человека, *D. melanogaster*, *C. elegans* и *Arabidopsis thaliana*. У высших эукариот для реализации NMD также необходимы другие белки, например, факторы SMG 1, 5-9, компоненты EJC-комплекса или PABP (см. ниже).

UPF1 представляет собой белок с АТФазной и 5'→3' РНК-хеликазной активностью. Данный белок является ключевым фактором NMD, связывающим процесс нонсенс-зависимой деградации мРНК с трансляцией. Нокаут гена UPF1 летален для мышей на стадии эмбриона, не удалось также получить гомозиготные UPF1<sup>-/-</sup> линии эмбриональных стволовых клеток мышей [24]. С-конец данного белка содержит четыре богатых серином и треонином кластера с 14-18 потенциальными сайтами фосфорилирования. Показана



важность циклического фосфорилирования-дефосфорилирования UPF1 в процессе NMD [25]. Фосфорилирование UPF1 катализируется фактором SMG1, который представляет собой киназу PIKK семейства (phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases). Дефосфорилирование UPF1 осуществляется фосфатазой PP2A при содействии факторов SMG5, SMG6 и SMG7. SMG5 связывается с обогащенным пролином и глицином участком на N-конце UPF1, кроме того, все три белка содержат 14-3-3-подобные домены [26] (Рисунок 1.1А).

Инактивация любого из белков SMG 1, 5-7 приводит к ингибированию NMD в клетках млекопитающих. Интересно отметить, что уровень транскрипта фактора SMG5 регулируется NMD, возрастая при ингибировании процесса. Данный эффект отмечен у человека и *D. melanogaster*, что позволяет предположить наличие консервативного механизма регуляции по типу обратной связи [27].

UPF2 рассматривают как адапторную молекулу, связывающую в процессе функционирования NMD факторы UPF1 и UPF3 (Рисунок 1.1Б). Связывающие UPF1 домены локализуются как на N-конце, так и на C-конце молекулы. По данным рентгеноструктурного анализа комплекса UPF2-UPF3 в контакте UPF2 с UPF3 участвуют отрицательно заряженные аминокислотные остатки eIF4G-подобных доменов UPF2 и положительно заряженные остатки  $\beta$ -листа UPF3. При отсутствии взаимодействия с UPF2 фактор UPF3 не связывается с РНК. Фактор UPF2 также связывает киназу SMG1, способствуя фосфорилированию UPF1.

Фактор UPF3 связывает UPF2 и белок Y14 комплекса EJC (Рисунок 1.1Б). По имеющимся данным, UPF3 имеют преимущественно ядерную локализацию. Считается, что он связывается с EJC комплексами на мРНК в ядре, после транспорта мРНК из ядра UPF3 связывает UPF2 [28].

Необходимый для осуществления NMD у млекопитающих комплекс EJC (exon junction complex) представляет собой гетероолигомер, включающий фактор элонгации eIF4AIII, связанный с АТФ, а также MAGOH, Y14 и другие белки. Комплекс формируется на мРНК в ядре в процессе сплайсинга и располагается на расстоянии 20-24 нуклеотида ближе к 5'-концу молекулы от места соединения двух экзонов (Рисунок 1.1Б). Образование комплекса начинается с присоединения к мРНК коровых белков eIF4AIII, MAGOH и Y14, которое происходит еще до соединения экзонов. eIF4AIII представляет собой АТФ-зависимую РНК-хеликазу, в комплексе EJC связывает мРНК с димером MAGOH-Y14. С комплексом EJC также связываются белки UPF2 и UPF3. После выхода

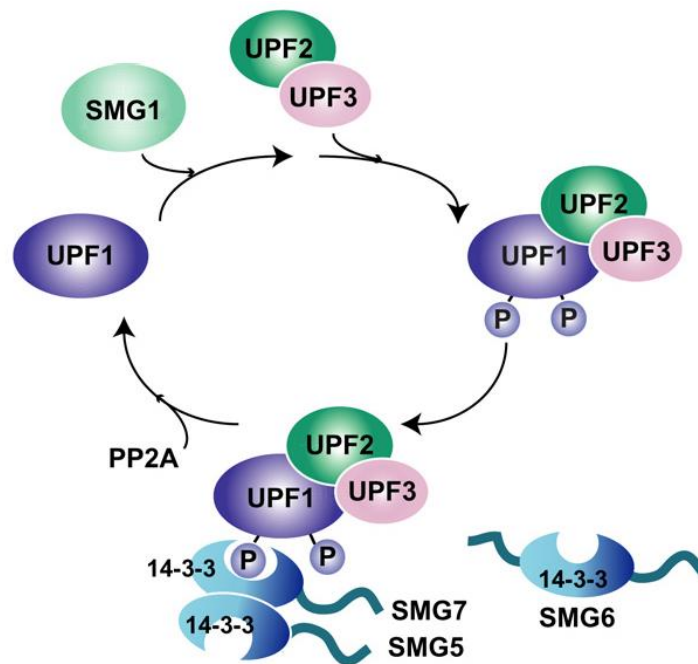
mРНК из ядра в ходе первого акта трансляции рибосома при помощи кофактора РУМ удаляет с молекулы комплексы EJC.

Таблица 1. Клеточная локализация, краткая биохимическая характеристика и функции факторов NMD

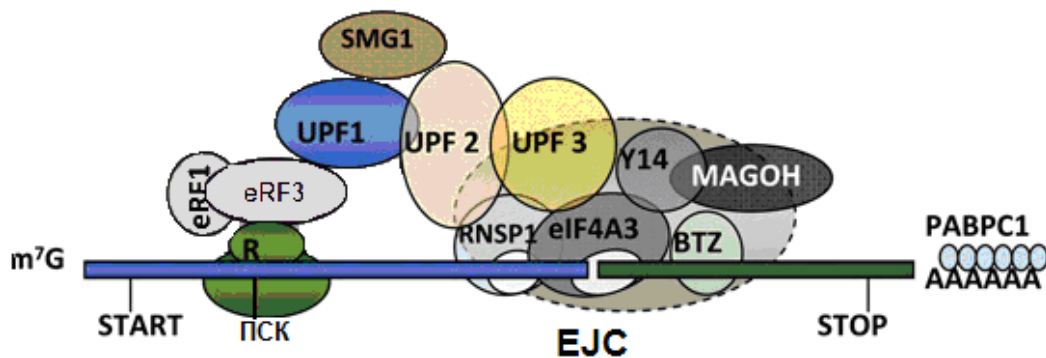
Белок	Локализация	Биохимическая характеристика	Функция	Ссылка
UPF1	Белок переходит из ядра в цитоплазму и обратно, но, главным образом, цитоплазматический	РНК-хеликаза, зависима от нуклеиновых кислот АТФ-аза, РНК-связывающий белок	NMD; активирует трансляцию; играет роль в репликации ДНК; участвует в поддержании теломер	24,29-35
UPF2	Цитоплазматический, главным образом перинуклеарный (также имеет NLS)	Фосфопротеин	NMD; активирует трансляцию; адаптер для EJC; участвует в поддержании теломер	36-39
UPF3a	Главным образом, ядерный, переходит из ядра в цитоплазму и обратно	РНК-связывающий белок, фосфопротеин	NMD; активирует трансляцию; EJC белок, взаимодействует с UPF2; участвует в поддержании теломер	40,41
UPF3b	Главным образом, ядерный, переходит из ядра в цитоплазму и обратно	РНК-связывающий белок, фосфопротеин	NMD; активирует трансляцию; EJC белок, взаимодействует с UPF2; участвует в поддержании теломер	40,42
SMG1	Цитоплазматический и ядерный	Серин/треонин киназа семейства PI3K, АТФ-связывающий белок, фосфопротеин	NMD; фосфорилирует UPF1; вовлечен в поддержание стабильности генома, ответ на стресс и репарацию ДНК	35,31
SMG5	Главным образом цитоплазматический, someядерный (переходит из ядра в цитоплазму и обратно)	PINc домены	NMD; взаимодействует с PP2A и вызывает дефосфорилирование UPF1	43,44

SMG6	Главным образом, цитоплазматический	PINс домены	NMD; взаимодействует с PP2A и вызывает дефосфорилирование UPF1. Эндонуклеаза	44,45
SMG7	Главным образом, цитоплазматический, переходит из ядра в цитоплазму и обратно	2 TPR повтора	NMD; взаимодействует с PP2A и вызывает дефосфорилирование UPF1	46,47,26
SMG8	Нет данных	Фосфопротеин	Образует комплекс с SMG1 и ингибирует его активность	48
SMG9	Нет данных	Фосфопротеин	Образует комплекс с SMG1	48
Y14	Ядерный и цитоплазматический	РНК-связывающий белок	Белок EJC комплекса; активирует трансляцию; образует гетеродимер с MAGOH, часть пре-EJC комплекса	28,50,49
MAGO H	Ядерный и цитоплазматический	РНК-связывающий белок, ацетилован	белок EJC комплекса; активирует трансляцию; образует гетеродимер с Y14, часть пре-EJC комплекса	50,51
eIF4A3	Ядерный и цитоплазматический	РНК-связывающий белок, РНК-хеликаза	белок EJC комплекса; часть пре-EJC комплекса	52,53,51
BTZ	Ядерный и цитоплазматический	РНК-связывающий белок, фосфопротеин	Белок EJC; взаимодействует с eIF4A3	54
PYM	Ядерный и цитоплазматический	Взаимодействует с Y14/ MAGOH	PYM участвует в разборке EJC и круговороте факторов EJC	55
hNAG	Нет данных	WD40 повторы	NMD	56
DHX34	Нет данных	АТФ-зависимая РНК-хеликаза	NMD	56

А



Б



**Рисунок 1.1 Белок-белковые взаимодействия в процессе NMD.** А. Цикл фосфорилирования-дефосфорилирования UPF1 в процессе NMD. Фосфорилирование катализируется SMG1 и требует участия UPF2 и UPF3. С фосфорилированным UPF1 связываются факторы SMG5, 6 и 7, что приводит к дефосфорилированию UPF1 фосфатазой A2. Б. Взаимодействие рибосомы, факторов терминации eRF1 и eRF3, белков UPF и EJC. Факторы терминации, связавшиеся с рибосомой, взаимодействуют с фактором UPF1, который, в свою очередь, через белки UPF2 и UPF3 взаимодействует с EJC. Факторы UPF1 и UPF2 связывают киназу SMG1. START – стартовый кодон,  $m^7G$  – кэп-структура на 5'-конце мРНК, STOP – стоп-кодон, PABPC1 – связывающий полиадениновую последовательность цитоплазматический белок 1. Остальные аббревиатуры см. Таблицу 1 выше. Из [25], с изменениями.

## 1.2.2 Механизм распознавания стоп-кодонов как ПСК

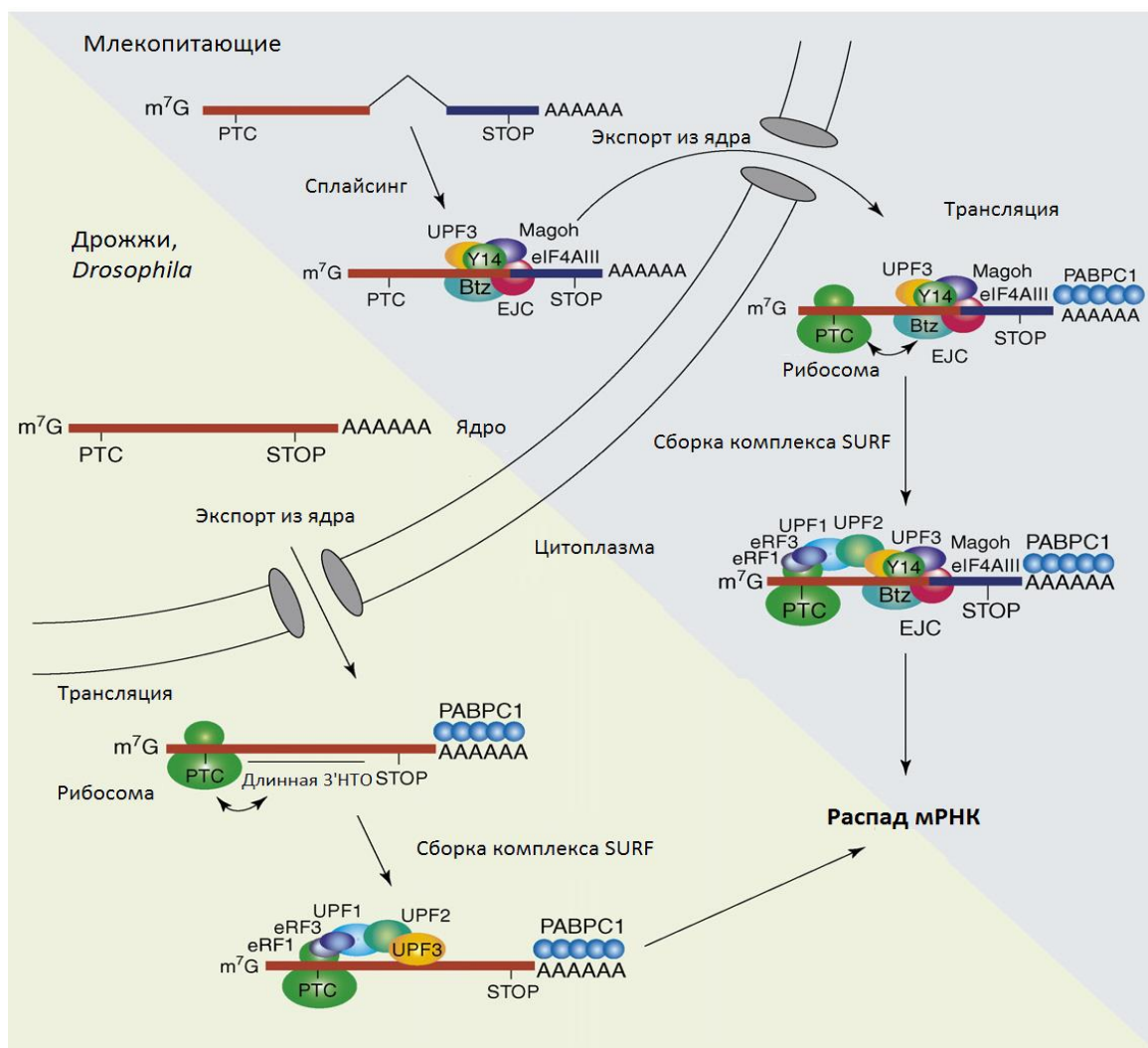
Ключевую роль в процессе NMD играет стадия распознавания терминирующего кодона как ПСК. В настоящее время в литературе описано две альтернативные модели распознавания ПСК.

Первая модель приписывает ведущую роль в механизме комплексу EJC, расположенному выше нормального стоп-кодона и ниже ПСК (Рисунок 1.2 и 1.3). При трансляции с нормальной мРНК рибосома удаляет все комплексы EJC. Если терминирующий кодон расположен на мРНК ближе к 5' концу, чем последнее место соединения экзонов, то ассоциированный с ним EJC не удаляется (Рисунок 1.3А). Распознавание стоп-кодона факторами терминации eRF1 и eRF3 приводит к остановке трансляции. Затем указанные факторы терминации связывают факторы NMD UPF1 и SMG1, формируется пост-терминаторный комплекс SURF. Комплекс SURF взаимодействует со связанными с EJC белками UPF2 и UPF3, взаимодействие приводит к фосфорилированию фактора UPF1 киназой SMG1 и диссоциации факторов eRF1 и eRF3. Затем под действием SMG5, 6 и 7 происходит дефосфорилирование UPF1 и распад мРНК [35]. Распад мРНК запускается эндонуклеазным расщеплением вблизи EJC фактором SMG6, а затем продолжается с 3' и 5' концов, блокируя трансляцию. Показано существование UPF2-независимого и EJC-независимого механизмов NMD у млекопитающих [57].

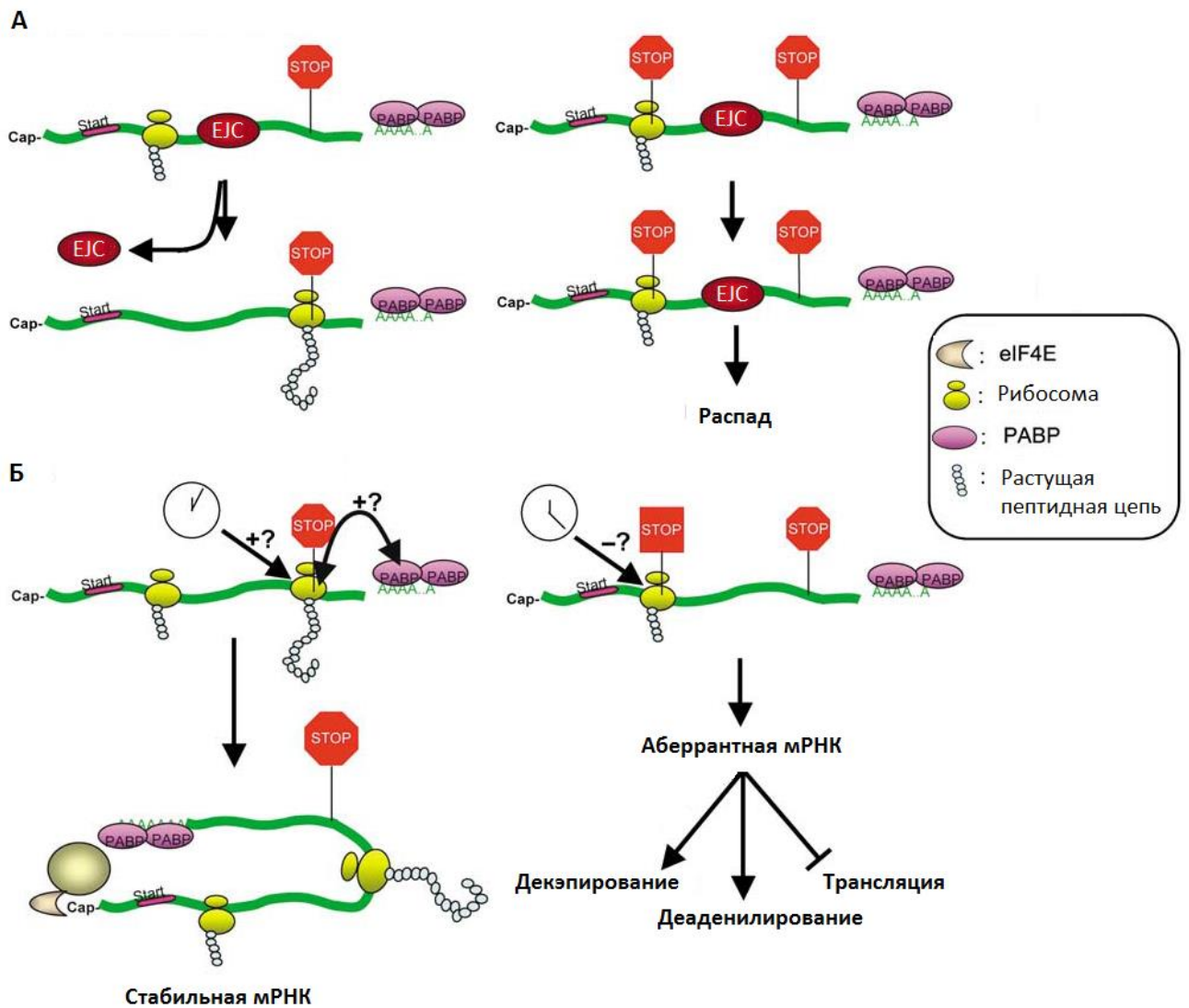
Вторая модель приписывает главную роль в распознавании ПСК и запуске NMD 3'-области мРНК после ПСК, которая отличается от нормальной 3'-нетранслируемой области мРНК. Нормальная терминация трансляции и стабильность мРНК зависит от взаимодействия рибосомы при терминации с набором белков, ассоциированных с 3'-нетранслируемой областью мРНК, включающим цитоплазматический связывающий полиадениновую последовательность белок PABPC1 (Рисунок 1.3Б). При нормальной терминации eRF1 распознает стоп-кодон в А-центре рибосомы и образует комплекс с eRF3, который, в свою очередь, взаимодействует с PABPC1. Взаимодействие eRF1-eRF3 комплекса с PABPC1 необходимо для эффективной терминации и диссоциации рибосомы от мРНК. При терминации на ПСК из-за отсутствия в непосредственной близости от стоп-кодона нормальной 3'-нетранслируемой области взаимодействия фактором терминации с PABPC1 не происходит. Это приводит к «застреванию» недиссоциированной рибосомы на ПСК и активации NMD через взаимодействие eRF1 и eRF3 с UPF1 (Рисунок 1.2). Описанная модель не исключает участия EJC, который также может препятствовать связыванию комплекса eRF1-eRF3 с PABPC1 [58].

Считается установленным, что первая из описанных моделей реализуется у млекопитающих, а вторая характерна для таких модельных организмов как *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* и *C. elegans* [58].

У *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* и *C. elegans* распознавание ПСК основано на том, что ПСК в отличие от нормального стоп-кодона не фланкирован 3'-нетранслируемой областью (3'-НТО) молекулы мРНК. 3'-НТО связана с рядом белков, включая связывающий полиадениновую последовательность белок PABPC1. Отсутствие данного белка к 3'-концу от ПСК приводит к снижению эффективности терминации и запуску NMD.



**Рисунок 1.2 Механизм NMD.** У млекопитающих распознавание ПСК осуществляется при помощи комплекса EJC и поэтому сопряжено с процессом сплайсинга. Терминация трансляции к 5'-концу от EJC приводит к взаимодействию факторов eRF1 и eRF3 с белком UPF1 и киназой SMG1. Затем UPF1 связывается с UPF2 и UPF3, что запускает цикл его фосфорилирования-дефосфорилирования и, наконец, распад мРНК. m<sup>7</sup>G – кэп-структура на 5'-конце мРНК, PTC – преждевременный стоп-кодон, STOP – стоп-кодон, PABPC1 – связывающий полиадениновую последовательность цитоплазматический белок 1. Остальные аббревиатуры см. Таблицу 1 выше. Из [27], с изменениями.



**Рисунок 1.3 Принципы распознавания ПСК.** *А.* Модель нонсенс-зависимой деградации мРНК с участием EJC в качестве маркера ПСК. Комплекс EJC выступает в качестве маркера ПСК, если он связан с мРНК после ПСК. Присутствие такого маркера запускает распад мРНК, содержащих ПСК (справа). При трансляции с нормальных мРНК рибосома удаляет все комплексы EJC с мРНК (слева), если комплекс EJC расположен к 3'-концу от стоп-кодона, то комплекс не удаляется, стоп-кодон распознается как ПСК и мРНК подвергается деградации (справа). *Б.* Распознавание ПСК с участием 3'-нетранслируемой области мРНК и аномальной терминации трансляции. Модель нарушения терминации подразумевает, что терминация трансляции на ПСК (STOP в квадратной рамке) отличается от терминации на нормальном стоп-кодоне (STOP в восьмиугольнике). При терминации трансляции на ПСК в отличие от нормального стоп-кодона рибосома не взаимодействует с PABP (взаимодействие рибосома-PABP показано двойной стрелкой), а также сам акт терминации на ПСК длится дольше (обозначено символом циферблата часов), что может служить сигналом для распознавания ПСК. Обе эти возможности не являются взаимоисключающими. Нормальная терминация приводит к стабильной мРНК, в то время как аберрантная терминация на ПСК приводит к нестабильной мРНК, которая претерпевает распад несколькими путями. Start – стартовый кодон, Cap – кэп-структура на 5'-конце мРНК, PABP – связывающий полиадениновую последовательность белок. Из [10], с изменениями.

### 1.2.3 Регуляция активности NMD

Механизм нонсенс-зависимой деградации мРНК (NMD) вызывает деградацию как нормальных физиологических транскриптов, так и аберрантных транскриптов, несущих стоп-кодоны в определенном контексте. Множество подверженных NMD мРНК подвергаются нормальному сплайсингу и приводят к образованию нормальных, не мутантных белков, но субстраты для NMD также зачастую образуются в результате альтернативного сплайсинга, который приводит к появлению стоп-кодонов до EJC комплексов. Альтернативные сигналы полиаденилирования также могут вызвать NMD, создавая транскрипты с длинными 3' НТО, что также запускает не зависящий от EJC путь NMD [59]. Открытие того, что NMD регулирует уровни множества не мутантных транскриптов, ставит вопрос о его физиологической значимости. Таким образом, NMD представляет собой двоякий механизм, который регулирует экспрессию нормальных генов и также функционирует в качестве механизма «контроля качества» мРНК. Было показано, что мутации, которые нарушают функционирование NMD, вызывают неврологические заболевания, что позволяет предположить, что NMD играет существенную роль в функционировании ЦНС. Недавно была идентифицирована специфичная для мозга микроРНК, miR-128, которая ингибирует NMD и таким образом контролирует экспрессию множества транскриптов в нейрональных клетках. miR-128 подавляет NMD, ингибируя трансляцию хеликазы UPF1 и корового компонента EJC комплекса MLN51. Способность miR-128 регулировать NMD является консервативной для позвоночных и была продемонстрирована для представителей земноводных, птиц и млекопитающих. Уровни miR-128 резко повышаются в дифференцирующихся нейрональных клетках и в ходе развития мозга, что ведет к ингибированию NMD и повышению уровня мРНК, которые обычно являются мишенями для NMD; наиболее представлены среди них транскрипты, которые кодируют белки, отвечающие за развитие нервной системы и ее функционирование. Вместе эти результаты показывают, что существует консервативный механизм регуляции NMD, связывающий NMD и микроРНК, который индуцирует образование специфичных для клеток транскриптов в ходе эмбрионального развития [60].

Недавно было показано, что уровень внутриклеточного кальция является ключевым регулятором NMD. При скрининге обширной библиотеки веществ для поиска потенциальных ингибиторов NMD авторы обнаружили, что сердечные гликозиды, в частности, убаин, вызывают ингибирование NMD. Так как главным эффектом ингибирования Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-АТФазы является повышение внутриклеточного уровня кальция,



авторы предположили, что именно уровень кальция влияет на активность NMD. Для проверки своей гипотезы исследователи обработали клетки U2OS, несущие биолюминисцентный репортер активности NMD, убаином и Bapta-AM, проникающим внутрь клеток хелатором кальция, позволяющим подавить кальциевый ток в цитоплазму. Bapta-AM подавлял ингибирующий эффект убаина по отношению к NMD. Это позволяет предположить, что уровень кальция действительно опосредует ингибиторный эффект сердечных гликозидов. Для подтверждения своей гипотезы авторы обработали трансфицированные репортером клетки различными низкомолекулярными соединениями, которые вызывают увеличение уровня внутриклеточного кальция благодаря различным механизмам. Они показали, что тапсигаргин, который вызывает увеличение уровня кальция в клетках за счет высвобождения кальция из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму, также ингибирует NMD, и этот эффект подавляется под действием Bapta-AM. Кроме того, ионофор для кальция A23187, который также напрямую вызывает увеличение уровня кальция в клетках, давал тот ингибиторный эффект по отношению к NMD. В итоге, полученные результаты показывают, что кальций является ключевым регулятором активности NMD в человеческих клетках [61].

### **1.3 Физиологическое значение процесса NMD, а также отдельных факторов NMD в норме и патологии**

Среди мишеней NMD центральное место занимают транскрипты с ПСК. Такие транскрипты включают несплайсированные мРНК, которые включают стоп-кодоны в интронах, альтернативно сплайсированные изоформы мРНК с ПСК и транскрипты псевдогенов, транспозонов и повторяющихся элементов [9,27]. Кроме транскриптов с ПСК в правильной рамке считывания существует множество других классов транскриптов, являющихся мишенями NMD. Среди них можно указать мРНК с открытыми рамками считывания в 5'-НТО (подвержены NMD не во всех случаях), мРНК, претерпевающие сдвиг рамки считывания при трансляции (при ошибках сдвига рамки считывания), мРНК селенопротеинов, мРНК с интронами в 3'-НТО, мРНК, транслирующиеся по механизму «протекающего» сканирования [27,23].

Полногеномное исследование транскриптома дрожжей, дрозофилы и клеток человека позволяет предположить, что NMD, который изначально рассматривали как механизм, устраняющий «ошибочные» транскрипты, играет ключевую роль в регуляции генной экспрессии [62]. Данные исследования также демонстрируют, что NMD напрямую или не напрямую регулирует представленность 3–10% всех мРНК в различных типах

клеток [20,63,64]. В некоторых случаях, NMD снижает уровень «генетического шума», разрушая транскрипты нефункциональных псевдогенов, транскрипты, кодируемые мобильными генетическими элементами, мРНК с открытыми рамками считывания в их 5'-НТО [65,27]. В других случаях NMD выполняет регуляторные функции.

### **1.3.1 Регуляция представленности мРНК селенопротеинов**

мРНК, содержащие триплет UGA, который вызывает включение селеноцистеина, также могут быть мишенями NMD в зависимости от уровня селена в клетке [66]. Селенопротеины содержат уникальную аминокислоту селеноцистеин (Sec), который кодируется триплетом UGA. Так как UGA также служит стоп-кодоном, было постулировано, что мРНК селенопротеинов являются мишенями для деградации посредством механизма нонсенс-зависимой деградации. Несколько исследований показали различия в экспрессии различных мРНК селенопротеинов при недостатке селена, так представленность некоторых транскриптов падала, в то время как другие транскрипты оставались на прежнем уровне. Было показано, что NMD играет роль в этом дифференцированном ответе мРНК селенопротеинов на наличие селена в среде. мРНК селенопротеинов были разделены на мишени NMD и устойчивые к NMD транскрипты на основании существующей модели распознавания ПСК. Примерно половина транскриптома селенопротеинов является восприимчивой к NMD и демонстрирует существенные изменения в представленности транскриптов в ответ на изменения содержания селена в среде. Другая половина транскриптов не является мишенями NMD и не отвечает на изменение содержания селена. Иммунопреципитация РНК с ключевым фактором NMD UPF1 показала, что наиболее чувствительные к уровню селена мРНК являются наиболее обогащенными при ко-иммунопреципитации с UPF1 в условиях дефицита по селену. Кроме того, деплеция киназы SMG1, ответственной за фосфорилирование UPF1 и активацию NMD, устраняла снижение количества этих чувствительных к селену транскриптов. Скорость распада чувствительных к уровню селену транскриптов уменьшалась при добавлении селена и приближалась к скорости распада нечувствительных к уровню селена транскриптов. [67].

### **1.3.2 NMD и ответ клеток на стресс**

Кроме того, эксперименты по нокауту ключевых факторов NMD, таких как белки UPF и киназы SMG, позволяют предположить, что NMD играет роль в регуляции

экспрессии физиологических транскриптов, вовлеченных в механизм ответа на стресс, развитие гемопоэтических стволовых клеток, регуляцию альтернативного сплайсинга, стабильность генома, прохождение клеточного цикла, поддержание длины теломер и эмбриональное развитие.

Мишени NMD, вовлеченные в гомеостаз питательных веществ и защиту при окислительном стрессе, имеют регуляторные функции. В клетках млекопитающих аминокислотное голодание вызывает общее ингибирование трансляции. Наиболее часто это ингибирование обусловлено фосфорилированием фактора инициации трансляции eIF2 $\alpha$ . Функциональные исследования комплекса инициации трансляции позволяют предположить, что фосфорилирование eIF2A ингибирует NMD [68]. Кроме того, анализ на микроматричных чипах показал, что ингибирование NMD, вызванное аминокислотным голоданием, повышало представленность множества транскриптов, вовлеченных в гомеостаз аминокислот [20]. eIF2 $\alpha$  также подвергается фосфорилированию при гипоксии, при этом NMD также ингибируется. Кроме того, также было показано, что представленность индуцируемых гипоксией мРНК, которые играют ключевую роль в ответе клеток на стресс, также повышается при ингибировании NMD [69]. Хотя общее ингибирование трансляции должно приводить к ингибированию NMD, который является зависимым от процесса трансляции, как было рассмотрено ранее, возможно, стабилизация мишеней NMD при клеточном стрессе может способствовать поддержанию метаболизма клеток.

### **1.3.3 Регуляция представленности транскриптов, возникающих путем альтернативного сплайсинга**

Транскриптомный анализ показал, что альтернативный сплайсинг и NMD вместе регулируют экспрессию генов, что дает еще один уровень пост-транскрипционной регуляции экспрессии. Масштабный анализ альтернативных изоформ известных человеческих генов позволяет предположить, что одна треть всех альтернативных транскриптов содержит ПСК и является мишенями для NMD [9].

Одним из объяснений высокой встречаемости несущих ПСК изоформ являются ошибки сплайсинга, которые идентифицируются и подавляются под действием NMD. Другое потенциальное объяснение заключается в том, что NMD и альтернативный сплайсинг функционируют в клетках в составе одного механизма регуляции представленности транскриптов мРНК. Было экспериментально показано, что этот

предполагаемый механизм, который назвали механизмом «регулируемого непродуктивного сплайсинга и трансляции» (RUST), регулирует экспрессию множества генов в различных организмах от дрожжей до человека [70]. Было показано, что данный механизм вовлечен в авторегуляцию экспрессии ряда белков, участвующих в процессе сплайсинга. Считается, что RUST через совместное действие альтернативного сплайсинга и NMD необходим для авторегуляции таких факторов сплайсинга как SC35, PTB и 9G8 [9]. Примечательно, что коровые компоненты сплайсосомы, такие как белок U1, белковые компоненты snRNP (малые ядерные рибонуклеопротеиды), такие как белки Sm и белок SF1, также регулируются альтернативным сплайсингом и NMD [71].

При рассмотрении отдельных случаев альтернативного сплайсинга стало очевидным, что некоторые консервативные случаи альтернативного сплайсинга приводят к образованию ПСК в транскриптах. В 20% случаев пропуска экзонов в ходе альтернативного сплайсинга, консервативных для *Homo sapiens* и *M. musculus* происходит образование ПСК, которые ведут к распаду транскриптов под действием NMD [72]. Кроме того, для 25% случаев пропускаемых в ходе альтернативного сплайсинга экзонов, которые при их включении в транскрипт вызывают NMD, стоп-кодона присутствуют во всех трех рамках считывания, что позволяет предположить, что единственной их функцией является индуцирование NMD [72]. Хотя случаи функционального сочетания альтернативного сплайсинга и NMD (AS-NMD) могут быть менее распространены, чем предполагалось в первых исследованиях по этой тематике, некоторые работы четко демонстрируют функциональность такого механизма для некоторых семейств генов. Например, было показано, что все члены семейства SR-белков человека и мыши регулируются с помощью AS-NMD, и, более того, эта регуляция опосредована участками ДНК с крайне высокой консервативностью, названными «ультраконсервативными элементами» (UCE) [73].

Регуляция по механизму AS-NMD генов SFRS2 (фактор сплайсинга, аргинин/серин богатый, 2; SC35), SFRS3 (фактор сплайсинга, аргинин/серин богатый, 3; SRp20), SFRS7 (фактор сплайсинга, аргинин/серин богатый, 7; 9G8) и PTBP1 (связывающий полипиримидиновый тракт белок 1) происходит с участием соответствующих белков как элементов петли негативной обратной регуляции [74–77]. Подобный механизм негативной обратной регуляции также установлен для некоторых других примеров AS-NMD, например, для генов, кодирующих рибосомальные белки L3 (RPL3) и L12 (RPL12) [78,79]. Это позволяет заключить, что регуляция экспрессии по механизму AS-NMD может быть важным и консервативным элементом регуляции экспрессии факторов сплайсинга.

Было замечено соответствие между деталями механизма AS-NMD и типом регулируемого фактора сплайсинга [80]. Механизм AS-NMD для белков семейства SR, которые активируют сплайсинг, основан на включении в транскрипт экзонов, несущих стоп-кодоны. Напротив, для белков hnRNP, которую обычно функционируют в качестве репрессоров сплайсинга, механизм AS-NMD основан на пропуске альтернативных экзонов, который приводит к сдвигу рамки считывания и появлению ПСК. Также было показано, что гены некоторых факторов сплайсинга включали высоко консервативные экзоны, которые являются альтернативно сплайсируемыми [81]. В некоторых случаях, предсказанные альтернативные экзоны были окружены большим количеством последовательностей, схожих с сайтом связывания фактора, который, как предполагается, подвергается авторегуляции [81].

Сочетание альтернативного сплайсинга и NMD легко вписывается в существующие модели регуляции генов. Это механизм позволяет использовать аппарат альтернативного сплайсинга для регуляции экспрессии белков в зависимости от различных стадий развития и специфичным для различных типов клеток образом.

Таким образом, было высказано предположение, что альтернативный сплайсинг и NMD вместе играют существенную роль в регуляции экспрессии генов.

Рассматривая феномен непродуктивного сплайсинга, ряд авторов пришли к выводу, что в некоторых случаях, в частности, для относительно молодых в эволюционном контексте экзонов, речь идет о случайных ошибках сплайсинга, которые исправляются посредством NMD, в то время как в случае возникших относительно давно и эволюционно консервативных экзонов, правдоподобным объяснением может быть функциональный механизм AS-NMD [82].

Кроме того, филогенетический анализ последовательностей показал, что NMD могут эволюционно возникнуть раньше механизма альтернативного сплайсинга. Это позволяет предположить, что главная роль альтернативного сплайсинга при его возникновении, возможно, сводилась к регуляции экспрессии по механизму RUST, а не к увеличению разнообразия протеома [83].

### **1.3.4 NMD и перестройки генов антител**

Как уже отмечалось выше, еще одним источником образования ПСК являются перестройки генома в процессе созревания лимфоцитов. Перестройка V-, D- и J-районов генов, нематричный синтез коротких последовательностей в местах соединений

указанных районов терминальной трансферазой, а также перенос последовательностей из комплементарной цепи в кодирующую цепь приводят к увеличению репертуара последовательностей. Вместе с тем указанные перестройки зачастую приводят к сдвигу рамки считывания и возникновению ПСК в кодирующей последовательности. К ПСК также могут приводить соматические мутации, возникающие в ходе созревания аффинности антител. В случае непродуктивной перестройки первого аллеля с возникновением ПСК перестраивается второй аллель, при этом механизм NMD резко снижает уровень мРНК, кодируемой непродуктивно перестроенным геном [18,84].

### **1.3.5 Участие отдельных факторов NMD в различных процессах физиологии клетки**

#### Поддержание структуры и функционирования хромосом

Глобальный анализ экспрессии в дрожжах показал, что значительная часть чувствительных к NMD генов кодирует белки, влияющие на структуру и функционирование хромосом, включая поддержание длины теломер, ремоделирование хроматина рекомбинацию и репарацию [85]. В дрожжах мРНК, кодирующие регуляторы активности теломеразы (Est1p, Est3p, Stn1p и Ten1p), каталитическую субъединицу теломеразы (Est2p) и белки, которые влияют на структуру теломер (Sas2p and Orc5p), являются мишенями NMD [86]. Кроме того, было показано, что некоторые факторы NMD непосредственно участвуют в защите теломер и поддержании их длины. Также было показано, что SMG5 и SMG6 человека взаимодействуют с теломеразой и вовлечены в поддержание длины теломер. Было показано, что UPF1, UPF2, UPF3, SMG1, SMG5, SMG6 и SMG7 присутствуют на концах теломер [87]. Деплеция UPF1, SMG1 и SMG6, и, в меньшей степени, UPF2 и SMG7, приводила к разрывам хромосом и потере теломер.

#### Репарация ДНК и регуляция клеточного цикла

Киназа SMG1 и UPF1 играют роль в репарации ДНК и регуляции клеточного цикла [88]. Киназа SMG1 участвует в ответе на стресс, вызванный повреждающими ДНК агентами, такими как УФ облучение, и фосфорилирует белки, участвующие в репарации ДНК. Деплеция SMG1 под действием РНКи в клетках U2OS приводила к накоплению двухцепочечных разрывов ДНК и обогащению клетками в G2–M-фазе. Деплеция UPF1 в клетках HeLa приводила к остановке роста клеток в S-фазе.

### Эмбриональное развитие

Исследование факторов NMD в *D. melanogaster* показало, что ключевые факторы NMD, такие как UPF1 и UPF2, являются необходимыми для развития личинок [89].

Нокдаун UPF1 у мышей приводил к гибели эмбрионов на ранней стадии развития. Схожим образом, при исследовании на *Arabidopsis thaliana* было показано, что гены UPF1 и SMG7 являются необходимыми для жизнеспособности зародышей, и мутантные аллели оказывают плеiotропный эффект, что позволяет предположить, что процесс NMD в растениях регулирует транскрипты с широким спектром активностей [90]. Исследования в *Danio rerio* показали, что деплеция ортологов UPF1, UPF2, SMG5 и SMG6 оказывает сильное воздействие на эмбриональное развитие и выживаемость эмбрионов. Однако, являются ли эти эффекты следствием инактивации пути NMD или потери функций отдельных его факторов, до сих пор остается открытым вопросом.

### **1.3.6 NMD и фенотипическое проявление генетических заболеваний**

По оценкам, приблизительно одна треть всех наследственных заболеваний вызвана нонсенс-мутациями или мутациями, приводящими к сдвигу рамки считывания, которые вводят в транскрипты ПСК [91]; рассмотрение вызванных ПСК заболеваний позволяет предположить, что NMD является ключевым модулятором фенотипического проявления множества генетических заболеваний (см. Таблицу 2). NMD оказывает двойное действие на проявление генетических заболеваний. В большинстве случаев NMD оказывает благотворное действие и способствует удалению транскриптов, которые кодируют укороченные с С-конца белки, которые оказывают или могут оказывать доминантно-негативный эффект. Описанный положительный эффект коррекции фенотипического проявления наследственных заболеваний под действием NMD можно проиллюстрировать на примере  $\beta$ -талассемии. Гемоглобин А представляет собой гетеротетрамер, состоящий из двух  $\alpha$ - и двух  $\beta$ -субъединиц, которые нековалентно связаны друг с другом. Указанное заболевание может вызываться рядом мутаций в гене  $\beta$ -глобина, большая часть из которых приводит к возникновению ПСК в первом или втором экзонах гена. При таких мутациях клиническая картина не развивается, накопления мутантной мРНК не происходит, что обусловлено ее деградацией. В случае гетерозиготных носителей с чувствительными к NMD мутациями в гене  $\beta$ -глобина (например, нонсенс-мутация NS39 в экзоне II), NMD разрушает мутантную мРНК и синтез мутантного белка в значительных количествах не происходит. Сниженное количество цепей  $\beta$ -глобина приводит к

накоплению избытка свободных  $\alpha$ -цепей, которые подвергаются протеолитической деградации. Однако, функция гемоглобина является скомпенсированной за счет продукции цепей  $\beta$ -глобина со второго аллеля. Таким образом, гетерозиготные субъекты являются по существу здоровыми и не имеют тяжелых проявлений заболевания. Напротив, устойчивые к NMD мутации ведут к выработке укороченных цепей  $\beta$ -глобина. Напротив, при мутациях в последнем 3'-экзоне проявляется атипичная доминантная форма  $\beta$ -талассемии, при которой мутантные транскрипты избегают деградации, их укороченные с C-конца продукты накапливаются в клетках-предшественниках эритроцитов. Механизмы протеолиза клеток-предшественников эритроцитов не справляются с избытком укороченных  $\beta$ -цепей и  $\alpha\beta$ -димеров, вследствие чего в клетках формируются характерные токсичные тельца включения [22,23]. Носители с описанным редким типом устойчивых к NMD мутаций имеют выраженную клиническую картину  $\beta$ -талассемии и наследуют ее по доминантному типу. Таким образом, NMD защищает большинство гетерозиготных носителей  $\beta$ -талассемии от клинического проявления заболевания.

Аналогичный тип наследования и молекулярный механизм характерен, например, для врожденной миотонии, вызванной мутациями в гене хлорного канала CLCN1 (NMD-чувствительные мутации приводят к рецессивной болезни Беккера, NMD-устойчивые мутации вызывают доминантную миотонию Томсена), а также ряда невропатий, связанных с демиелинизацией в периферической нервной системе (Таблица 2).

В некоторых случаях, NMD, напротив усугубляет фенотипическое проявление заболевания, когда деградации подвергается транскрипт с ПСК, кодирующий усеченный белок с частично сохраненной функцией. Примерами таких мутаций и связанных с ними заболеваний могут служить мутации в гене дистрофина и связанная с ними мышечная дистрофия Дюшена, и мутации гена CFTR, вызывающие муковисцидоз [23]. Нонсенс-мутации в гене дистрофина, которые делают транскрипт мишенью для NMD, предотвращают синтез укороченного белка, который может обладать полной или частичной функциональностью, что приводит к тяжелой форме заболевания, которая называется мышечная дистрофия Дюшена, в то время как нонсенс-мутации, приводящие к транскриптам, устойчивым к NMD, и обеспечивающим синтез укороченного с C-конца белка дистрофина, ассоциированы с более легкой формой заболевания, называемой мышечной дистрофией Бекера.

В настоящее время большое внимание уделяется изменениям процессов сплайсинга и NMD в опухолевых клетках [92]. Было показано, что механизм NMD приводит к



деградации нескольких мутантных форм опухолевых супрессоров, таких как p53, причем продукты указанных мутантных генов являются мощными онкогенами [27]. Таким образом, NMD защищает гетерозиготных носителей таких мутаций от развития рака. Значение NMD при раке также было показано в исследовании пациентов с HDGC (наследственный диффузный рак желудка) и мутациями гена CDH1 (кадгерин-1) [93]. Примерно 80% ассоциированных с HDGC мутаций в гене CDH1 приводят к появлению ПСК и делают транскрипт мишенью NMD. Пациенты, имеющие CDH1 с ПСК, которые должны быть мишенями NMD, характеризуются более ранним проявлением рака желудка по сравнению с пациентами, которые имеют CDH1 с ПСК, которые устойчивы к NMD. Эти данные демонстрируют, что в данном случае разрушение мРНК CDH1 с укороченными с С-конца открытыми рамками считывания под действием NMD оказывает неблагоприятный эффект на течение HDGC [93]. Аналогичная связь между NMD и экспрессией генов опухолевых супрессоров была показана для ряда других случаев, например, для BRCA1 и WT1. Подводя итог, можно заключить, что влияние NMD на клиническую картину различных заболеваний предполагает, что усиление или ингибирование активности NMD представляют собой потенциальные стратегии для лечения с широким применением в медицине.

Таблица 2. Клинические состояния, при которых NMD влияет на фенотип заболевания

Название гена	Фенотип	ссылка
β-глобин (HBB)	5' ПСК: рецессивно наследуемая β-талассемия; гетерозиготы здоровы 3' ПСК: доминантно наследуемая β-талассемия	94,95
Родопсин (RHO)	5' ПСК: рецессивно наследуемая слепота; гетерозиготы имеют аномалии на ретинограмме, но без клинических проявлений 3' ПСК: доминантно наследуемая слепота	96,97
SRY-box (SOX10) 10	5' ПСК: гаплонедостаточность ведет к врожденной нейросенсорной глухоте и аганглиозу толстой кишки 3' ПСК: доминантно наследуемые дефекты развития нервной системы и аганглиоз толстой кишки	98
Рецептор интерферона-γ (IFNGR1) 1	5' ПСК: рецессивно наследуемая восприимчивость к микобактериальной инфекции; гетерозиготы здоровы 3' ПСК: доминантно наследуемая восприимчивость к микобактериальной инфекции	99,100
Cone-rod homeobox	5' ПСК: гомозиготы не описаны; гетерозиготы здоровы 3' ПСК: доминантно наследуемый врожденный амароз	101

containing gene (CRX)	Лебера	
Орфанный рецептор, родственный рецепторной тирозинкиназе 2 (ROR2)	5' ПСК: рецессивно наследуемый синдром Робина (недоразвитие половых органов, аномалии развития позвоночника), гетерозиготы здоровы 3' ПСК: доминантно наследуемая брахидактилия типа В (укорочение пястных костей)	102
Хлоридный канал 1, скелетная мускулатура (CLCN1)	5' ПСК: рецессивно наследуемое заболевание Бекера 3' ПСК: доминантно наследуемая болезнь Томсена (заболевание мышц, характеризующееся неспособностью мышц расслабляться)	103
Фактор Вон Виллебрандта (VWF)	5' ПСК: рецессивно наследуемая болезнь Виллебрандта 3 типа; гетерозиготы здоровы 3' ПСК: доминантно наследуемая болезнь Виллебрандта типа 2A3	104
Фактор свертывания X (F10)	5' ПСК: рецессивно наследуемая склонность к кровотечениям; гетерозиготы здоровы 3' ПСК: доминантно наследуемая склонность к кровотечениям	105
Основной белок миелина (MPN)	5' ПСК: гаплонедостаточность, болезнь Шарко-Мари-Тута (невропатия с потерей мышечной ткани и чувствительности к прикосновениям) 3' ПСК: доминантно-негативная врожденная невропатия, сопровождающаяся гипомиелинизацией	98
Эластин (ELN)	5' ПСК: гаплонедостаточность, болезнь клапанов сердца 3' ПСК: доминантно-негативная врожденная халазодермия, заболевание соединительной ткани	106
Коллаген I типа, α1 (COL1A1)	5' ПСК: доминантно наследуемое несовершенное костеобразование (OI) типа I (форма средней тяжести) 3' ПСК: OI типа II–IV (тяжелая форма)	107,108
Мутированный ген атаксии-телеангиэктазии (ATM)	5' ПСК: атаксия средней тяжести 3' ПСК: тяжелая форма с коротким временем выживания	109
Survival motor neuron gene (SMN1)	5' ПСК: спинальная мышечная атрофия (SMA) типа III (средней тяжести) 3' ПСК: спинальная мышечная атрофия (SMA) типа I (тяжелая форма)	110,111
Дистрофин (DMD)	ПСК в различных позициях могут вызвать тяжелую форму или форму средней тяжести. Однако наиболее часто 5' ПСК вызывают тяжелую форму мышечной дистрофии (DMD) 3' ПСК вызывают более легкие формы мышечной	112

	дистрофии (BMD)	
Ген регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR)	ПСК в различных позициях могут вызвать тяжелую форму или форму средней тяжести. Однако наиболее часто 5' ПСК вызывают тяжелую форму CF 3' ПСК: вызывают более легкие формы CF. Пациенты с менее эффективным NMD лучше отвечают на лечение.	113
Paired box 6 (PAX 6)	5' ПСК: аниридия, врожденное отсутствие радужной оболочки 3' ПСК: не обнаружено, однако доминантно-негативный мутант должен вызывать тяжелый фенотип	114
Ген рецептора Эктодисплазина-А (EDAR)	5' ПСК: аутосомная рецессивная ангидротическая эктодермальная дисплазия (HED) 3' ПСК: аутосомная доминантная ангидротическая эктодермальная дисплазия (HED)	115,116
Бета-субъединица натриевого канала (SCNN1B)	5' ПСК: аутосомный рецессивный псевдо гипоальдеростеронизм I (PHA1) 3' ПСК: доминантный синдром Лиддла	117,118

#### Применяемые в настоящее время подходы к терапии ассоциированных с NMD заболеваний

В связи с терапевтической значимостью NMD предпринимаются попытки воздействия на активность процесса у пациентов с дистрофией Дюшена и муковисцидозом, однако терапевтическое применение ограничено неполнотой сведений о механизме процесса NMD и проблемами с селективным воздействием на ткани-мишени.

Наличие большого количества ассоциированных с ПСК врожденных заболеваний, для которых пока не существует эффективного лечения, позволяет сделать вывод о потребности в разработке средств для фармацевтической регуляции активности NMD. В зависимости от эффекта NMD на патологический процесс в качестве лечебной стратегии может быть выбрана как активация, так и ингибирование NMD [119]. Однако в настоящее время в клинической практике применяют только ингибиторы NMD, что может оказать благотворный эффект в случае заболеваний, при которых мутированные белки с ПСК частично сохраняют свою функциональность (Таблица 3). Разработка новых лекарственных средств и подходов для изменения активности NMD требует более глубокого понимания механизма самого процесса и функциональных последствий изменений его активности.

При ряде заболеваний, при которых активность NMD усугубляет их клиническое проявление, прочтение стоп-кодонов при трансляции, которое приводит к синтезу белков с миссенс-мутациями, но частично сохраняющих их функциональную активность, является полезной стратегией для лечения.

#### Аминогликозиды

Аминогликозидные антибиотики способны связываться с декодирующим участком рибосомы и снижать точность спаривания кодон-антикодон. Таким образом, нарушается распознавание стоп-кодонов и вместо терминации цепи в полипептидную цепь включается аминокислота [120]. Этот эффект аминогликозидов сначала применили для лечения муковисцидоза [121], а затем для лечения других заболеваний. После успешных испытаний на животных были проведены клинические исследования применения гентамицина на пациентах с муковисцидозом и мышечной дистрофией Дюшена [122,123]. Исследования показали, что аминогликозиды могут вызывать прочтение стоп-кодонов нонсенс-мутаций *in vivo* и приводят к экспрессии полноразмерных белков. Однако необходимость применения высоких концентраций аминогликозидов при их системном (внутривенном) введении и их известные побочные эффекты, такие как повреждение почек и потеря слуха, ограничивают клиническое применение этого подхода.

#### PTC124

PTC124 представляет собой производное 1,2,4-оксидиазола, являющееся новым лекарственным средством для лечения таких как наследственных заболеваний как DMD и муковисцидоз. Первоначально PTC124 был идентифицирован при высокопроизводительном скрининге по его способности вызывать прочтение нонсенс стоп-кодонов. В культивируемых клетках от пациентов с DMD и на модели DMD на мышцах обработка PTC124 приводила к получению полноразмерного дистрофина [124]. Было показано, что PTC124 вызывает специфическое прочтение преждевременных стоп-кодонов, не затрагивая нормальные стоп-кодона и не вызывая образование аномально длинных белков. PTC124 исследовали в фазе II клинического исследования на пациентах с муковисцидозом и DMD. Низкий уровень побочных эффектов для этого препарата делает PTC124 привлекательным кандидатом для дальнейших исследований [125].

## Супрессорные тРНК

При этом подходе применяют химерные тРНК, которые специфически распознают один из трех стоп-кодонов и приводят к включению аминокислоты в полипептидную цепь на месте стоп-кодона. Исследования на  $\beta$ -талассемии и DMD показали, что экспрессия супрессорных тРНК в культурах клеток приводила к частичному восстановлению экспрессии содержащих ПСК аллелей дистрофина и  $\beta$ -глобина [126,127]. Главным недостатком этого подхода является отсутствие эффективного способа доставки и поддержания экспрессии супрессорных тРНК в необходимых типах клеток у пациентов. Еще одной проблемой является потенциальная иммунная реакция против гетерологичной супрессорной тРНК и необходимость использования вирусных векторов для генной терапии.

## Терапия, основанная на удалении содержащей ПСК части мутантного транскрипта

В данном случае стратегия состоит в устранении непосредственно той части мутантного транскрипта, которая содержит ПСК, делающий транскрипт мишенью для NMD. В одном варианте в том случае, когда ПСК вызваны нарушениями корректного сплайсинга, в данном подходе для восстановления нормального сплайсинга применяют антисмысловые олигонуклеотиды [128]. Впервые данный подход применили для коррекции нарушений сплайсинга гена  $\beta$ -глобина [129]. Позднее данный подход был применен для коррекции сплайсинга содержащей ПСК мРНК дистрофина [130]. Несмотря на потенциальную высокую специфичность данного подхода его широкому применению в медицине мешают хорошо известные проблемы генотерапии человека (системы доставки терапевтических олигонуклеотидов, эффективность трансфекции, иммунный ответ), его сложность и высокая стоимость.

## Терапия на основе ингибиторов NMD

Активация и ингибирование активности процесса NMD может принести пользу при лечении различных генетических заболеваний (Таблица 2). Вследствие этого были предприняты попытки идентификации соединений, которые могут напрямую влиять на активность факторов NMD и процесса в целом.

При болезни Ульриха мутация, приводящая к сдвигу рамки считывания и образованию ПСК в гене коллагена VI  $\alpha 2$ , вызывает потерю коллагена VI и

функциональным дефектам в ЕСМ (внеклеточный матрикс). Было показано, что применение ингибиторов ключевой для процесса NMD киназы SMG1, таких как вортманнин и кофеин, которые блокируют NMD, повышает экспрессию мутантной  $\alpha 2$  субъединицы коллагена VI, что приводит к сборке коллагена VI и образованию частично функционального ЕСМ [131]. Эти результаты показывают, что ингибиторы NMD могут быть перспективными инструментами для терапии генетических заболеваний человека, течение которых усугубляется за счет активности NMD. Несмотря на удачные эксперименты по ингибированию NMD вортманнином и кофеином в клеточной культуре высокая токсичность указанных соединений в терапевтической дозе ограничивает их применение в клинической практике. Учитывая множественность физиологических функций NMD его факторов разработка препаратов, которые будут эффективными и в достаточной степени безопасными, будет являться сложной задачей.

Таблица 3. Применяемые подходы к лечению ассоциированных с ПСК заболеваний

Применяемые соединения	Механизм действия	Тестируемые модели	Примечание
Аминогликозиды	Прочтение стоп-кодонов при трансляции, включение аминокислот на месте ПСК	Пациенты с муковисцидозом и культивируемые клетки от пациентов с BMD и DMD	Требуются высокие дозы, вводимые внутривенно, тяжелые побочные эффекты аминогликозидов, повреждение почек, потеря слуха
PTC124	Прочтение стоп-кодонов при трансляции	Пациенты с муковисцидозом и DMD, исследование II фазы	Проскринировано 80000 соединений
Супрессорные тРНК	Химерные тРНК распознают стоп-кодон и вводят на его месте аминокислоту	Культивируемые клетки от пациентов с DMD	Отсутствует эффективный способ доставки, вероятность иммунной реакции, потенциальный эффект супрессорных тРНК на другие мРНК с тем же стоп-кодоном
Антисмысловые олигонуклеотиды	Короткие последовательности нуклеотидов связывают определенные последовательности на мРНК для подавления или изменения	Культивируемые клетки от пациентов с DMD и модели DMD на мышах	Отсутствует эффективный способ доставки, вероятность иммунной реакции, недостаточная эффективность трансфекции

	сплайсинга для предотвращения появления ПСК в мРНК		
Ингибиторы NMD	Применение ингибиторов кофакторов NMD	Культивируемые фибробласты пациентов с болезнью Ульриха	Недостаточная безопасность существующих ингибиторов

## 1.4 Существующие подходы для исследования процессинга и деградации мРНК

### 1.4.1 Основные методы, применяемые для исследования процесса сплайсинга

Классические методы для изучения альтернативного сплайсинга включают анализ методом нозерн-блоттинг и обратную транскрипцию – полимеразную цепную реакцию (ОТ–ПЦР). Современные высокопроизводительные подходы, такие как гибридизация с олигонуклеотидными чипами широкомасштабное секвенирование транскриптомов вместе с биоинформатической обработкой полученных результатов, позволяют проводить масштабный анализ альтернативного сплайсинга множества транскриптов [1,6].

В последнее время было разработано несколько подходов для анализа альтернативного сплайсинга с использованием зеленого флуоресцентного белка (GFP) и других флуоресцентных белков, например, красного флуоресцентного белка (RFP) [3, 132–134]. Как и другие методы анализа на основе флуоресцентных белков, они позволяют не инвазивно оценивать активность процесса *in vivo*.

Указанные репортеры сплайсинга были использованы для скрининга связывающих РНК белков или регуляторных путей, которые модулируют сплайсинг конкретных транскриптов, а также для идентификации клеток в смешанных популяциях, которые обладают паттерном сплайсинга, который отличается от сплайсинга в большинстве клеток популяции. В указанных подходах альтернативный сплайсинг обычно обеспечивает включение-выключение экспрессии GFP, так что вырезание или включение в транскрипт альтернативных участков сдвигает рамку считывания GFP. Главным недостатком репортеров на основе одного флуоресцентного белка является то, что относительная встречаемость того вида сплайсинга, который приводит к экспрессии GFP, не может быть количественно оценена по отношению к другим видам сплайсинга транскрипта репортера. Экспрессия GFP не позволяет оценить, является ли мРНК, кодирующая GFP, основной или минорной формой мРНК, которая образуется в ходе транскрипции и сплайсинга репортера. То есть, такие репортеры позволяют оценить альтернативный сплайсинг, при

котором происходит образование только одной из двух изоформ транскрипта взаимоисключающим образом, поскольку сравнить интенсивности флуоресценции различных клеток без внутреннего контроля не представляется возможным вследствие различий в экспрессии репортера от клетки к клетке. При этом большая часть случаев альтернативного сплайсинга не регулируется таким образом, а приводит к образованию смеси альтернативных продуктов в различном соотношении. Один из подходов, который позволяет частично обойти это препятствие, подразумевает использование двух флуоресцентных белков со спектрально различимыми сигналами, каждый из которых включен в состав отдельного репортерного гена [135]. При этом каждый репортерный ген обеспечивает флуоресцентный сигнал в своем канале при прохождении одной из форм сплайсинга. Ко-трансфекция клеток обеими конструкциями позволяет оценить изменения в соотношении двух изоформ транскриптов под действием внешних сигналов в контексте уменьшения или увеличения относительной представленности одного из транскриптов, но не позволяет рассчитать относительные представленности изоформ мРНК в клетке.

Описанные методы отслеживания альтернативного сплайсинга с использованием двух флуоресцентных белков основаны на сравнении интенсивности флуоресценции клетки в одном канале флуоресценции (первая изоформа транскрипта) с интенсивностью во втором канале флуоресценции (вторая изоформа транскрипта) методом флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Такое прямое сравнение интенсивности флуоресценции в одном канале с интенсивностью флуоресценции в другом канале не применимо для оценки молярного соотношения двух форм транскриптов, так как (а) различные флуорофоры имеют различные коэффициенты молярного поглощения и экстинкции, (б) интенсивность возбуждающего света значительно различается в различных областях спектра, возбуждающих разные флуорофоры и (в) детекторы имеют разную чувствительность в различных областях спектра эмиссии.

Таким образом, ранее опубликованные методы отслеживания альтернативного сплайсинга с помощью флуоресцентных репортеров не позволяют рассчитать относительные представленности изоформ мРНК в клетке даже в случае использования двух флуоресцентных белков.

#### **1.4.2 Основные методы, применяемые для исследования процесса NMD**

В качестве основного метода исследования влияния NMD на транскриптом и его значимости для жизнедеятельности клеток и организмов чаще всего используют нокауты



генов-эффекторов NMD. Такой метод позволяет косвенно оценить эффект ингибирования исследуемого процесса. Однако существует множество доказательств функциональной диверсификации основных белков, вовлеченных в процесс NMD. Показано участие факторов UPF1, SMG5 и SMG6 в поддержании структуры теломер, репарации ДНК и регуляции клеточного цикла [17]. Как следствие, нокаут гена позволяет оценить не только суммарный эффект ингибирования NMD, при этом потери других функций нокаутного белка затрудняют интерпретацию данных, что может привести к переоценке значения процесса для отдельных типов клеток.

Недавно был предложен метод [136] анализа NMD в клетках с помощью репортерной системы на основе GFP (GFP - green fluorescent protein). Репортерная система включала в себя часть гена  $\beta$  рецептора Т клеток мыши, в область экзона которого встроена открытая рамка считывания GFP таким образом, что стоп кодон GFP распознавался как ПСК. При экспрессии такой плазмидной конструкции в клетках млекопитающих уровень флуоресценции GFP был низким в результате прохождения NMD. В этой работе впервые показана возможность визуализации процесса NMD на уровне отдельных живых клеток. Недостатком данного метода является отсутствие контроля уровня экспрессии репортерной конструкции.

В другой работе [137] для количественного анализа NMD в клетках млекопитающих использовали ко-экспрессию двух химерных генов, один из которых кодировал люциферазу морского пера *Renilla*, а другой – люциферазу светляков. При этом транскрипт с люциферазой *Renilla* служил мишенью для NMD, а транскрипт с люциферазой светляков - контролем для нормирования на уровень экспрессии. Такая система с использованием двух независимых люцифераз обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью, что позволяет проводить высокопроизводительный поиск веществ-ингибиторов NMD.

NMD представляет собой один из ключевых механизмов в экспрессии генов, который обеспечивает супрессию нонсенс-мутаций и таким образом вовлечен в «контроль качества» мРНК на пост-транскрипционном уровне. С точки зрения механизма процесса он включает взаимодействие ядерных и цитоплазматических систем экспрессии генов, где информация о структуре гена передается в цитоплазму через позиционирование белковых комплексов на молекуле мРНК.

Процесс NMD также позволяет объяснить различие в фенотипическом проявлении множества генетических заболеваний, и лучшее понимание механизма и функциональной значимости данного процесса обеспечивает перспективы для разработки новых подходов к лечению наследственных заболеваний.

Несмотря на большой прогресс в изучении процесса NMD в последнее время до сих пор нет полной ясности относительно механизма распознавания ПСК в клетках млекопитающих и функциональной значимости самого NMD. Появившиеся в последнее время сведения о специфической регуляции NMD под действием микроРНК и изменения концентрации внутриклеточного кальция ставят перед исследователями новые вопросы и позволяют пересмотреть сложившееся ранее представление о роли NMD в клетках. Дальнейшее изучение роли NMD в таких физиологических феноменах как эмбриональное развитие, защита против вирусной инфекции, канцерогенез, гетерогенность клеточных популяций и ответ на клеточный стресс требует разработки новых инструментов для его исследования, в частности, эффективных репортерных систем, позволяющих точно и быстро оценивать изменение активности NMD на уровне отдельных клеток и в динамике.

В свете вышеизложенного актуальной задачей видится разработка метода оценки процесса нонсенс-зависимой деградации мРНК на уровне отдельных клеток с помощью флуоресцентных белков.

## ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целью данной работы было создание генетически кодируемых инструментов для исследования процессов процессинга и деградации мРНК на уровне отдельных клеток с помощью флуоресцентных белков.

Для выполнения данной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить возможность использования пары флуоресцентных белков TagGFP2 и Katushka для создания генетических репортерных конструкций для мониторинга процессинга РНК *in vivo*.
2. Сконструировать различные варианты репортерных конструкций для оценки активности процесса NMD в клетках млекопитающих *in vivo*.
3. Протестировать полученные конструкции на возможность отслеживания изменения активности NMD с помощью известных ингибиторов процесса.
4. Оценить активность NMD в различных линиях клеток и первичных культурах клеток в различных условиях с помощью созданных репортерных конструкций.
5. Оценить возможность применения созданных репортерных конструкций для отслеживания активности NMD в динамике в эмбрионах шпорцевых лягушек *Xenopus laevis*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы

#### 2.1.1 Вектора

Репортерные плазмиды pNMD<sup>+</sup> и pNMD<sup>-</sup>, pSMG5-NMD<sup>+</sup> и pTRAM1-NMD<sup>-</sup>, а также версия плазмиды pNMD<sup>+</sup> без интрона во фрагменте гена β-глобина были сконструированы в лаборатории на основе векторе pAqMNavLesZip1, который был любезно предоставлен Д.С.Щербо (Евроген). Вектора, кодирующие флуоресцентные белки TagGFP2 и Katushka, pTurboFP635-N и pTagGFP2-N, а также вектора TurboYFP-dest и pmKate2-C были приобретены в компании Евроген.

pSplPIG и pCtrlPIG были получены на основе вектора pTurboFP635-C (Евроген).

Для экспериментов по нокауту генов плазмиды были сконструированы на основе вектора pGreenPuro (System Biosciences).

#### 2.1.2 Реактивы и расходные материалы для клонирования

Для клонирования и конструирования плазмид использовали наборы реактивов для ПЦР Tersus и Encyclo, готовую смесь для скрининга колоний бактерий с помощью ПЦР ScreenMix, наборы для очистки фрагментов ДНК из геля и реакционных смесей Cleanup Standard и Cleanup Mini, набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген), набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Midi Kit (Qiagen), ферменты рестрикции AgeI, BamHI, CciNI (NotI), BglII, HindIII, XbaI, PstI, EcoRI, SalI, Tth111I и подходящие для них буферы рестрикции от того же производителя, маркёры длин фрагментов ДНК (SibEnzyme, Россия), T4 ДНК-лигазу (Евроген).

Синтез олигонуклеотидных праймеров и секвенирование полученных генетических конструкций заказывали в компании Евроген.

Для получения генетических конструкций использовали бактериальные химические компетентные клетки *E. coli* штамма X11 Blue (Invitrogen, США). Также для генетических манипуляций с бактериями были использованы стерильные пластиковые чашки Петри, агар, антибиотики канамицин (ПанЭко) и пенициллин (ПанЭко), микробиологическая среда LB (1% бакто-триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl, pH 7,5) и микробиологическая среда SOB (2% бакто-триптон, 0,55% дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 8,0), агароза для гель-

электрофореза ДНК, бромистый этидий, Трис-ацетатный буфер (40 mM Трис-ацетат, 1 mM ЭДТА, pH 8,0) и буфер для нанесения образцов ДНК для электрофореза (50% глицерин, 0,25% бромфеноловый синий).

### **2.1.3 Оборудование и программное обеспечение для клонирования**

Для проведения реакций ПЦР использовали амплификатор PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research), для культивирования ночных культур *E.coli* применяли термостат-шейкер Excella 25 (Eppendorf), для исследования фрагментов ДНК и препаратов плазмидной ДНК использовали камеру для горизонтального гель-электрофореза с источником постоянного тока EC370 Minicell (E-C Apparatus), также использовали систему гель-документирования Alpha Imager 2000 (Alpha-InnoTech) и твёрдотельный, суховоздушный и водный термостаты. Концентрации образцов ДНК и РНК измеряли с использованием микроспектрофотометра NanoDrop 2000C (Thermo Scientific).

Для планирования генно-инженерных манипуляций, конструирования плазмид и анализа результатов секвенирования фрагментов ДНК использовали программы Vector NTI (Life technologies), EditSeq и SeqMan из пакета программного обеспечения Laser gene (DNASTAR). Также использовали программы для выравнивания последовательностей ДНК, доступные онлайн (BLAST на сайте NCBI), и программу для поиска сайтов рестрикции NEBcutter. Для амплификации фрагментов ДНК со сложных матриц (фрагменты генов  $\beta$ -глобина, TRAM, SMG5 и UPF1) пользовались онлайн ресурсами для дизайна праймеров на сайте NCBI.

### **2.1.4 Эукариотические клеточные линии, культуральные среды и расходные материалы**

Клеточные линии HEK293 и HeLa Kyoto и были приобретены в ATCC. Линия мышинных эмбриональных стволовых (ES) клеток CTMI-2 была приобретена у компании Millipore. Клетки MEF были выделены из эмбрионов мышей и любезно предоставлены Е.И. Кудрявцевой.

Среды DMEM, Opti-MEM, раствор Версена, трипсин (сухой), пенициллин-стрептомицин (сухой), эмбриональная бычья сыворотка (FBS), фосфатно-солевой буферный раствор в таблетках и сухой глутамин были приобретены у ПанЭко, пурамицин приобретали от Sigma.

Реактив для трансфекции FuGene 6 был приобретён у компании Roche. Для трансфекции ES клеток использовали одноразовые кюветы для электропорации Lonza и набор реагентов для электропорации ES клеток Amaha Mouse ES Cell Nucleofector® (Lonza).

Также использовали 75 см<sup>2</sup> флаконы для культивирования клеток (ЛабТэк), пластиковые пробирки с коническим дном на 15 и 50 мл (Falcon), 3, 5 см чашки с пластиковым дном (MatTek).

Для культивирования первичных клеток ES и MEF использовали ингибирующий лейкемию фактор (LIF) (ESGRO от Chemicon). Для инактивации фидерных клеток применяли митомицин С (Sigma).

Кофеин, циклогексимид и актиномицин Д приобретали от Sigma.

### **2.1.5 Оборудование для работы с клеточными линиями и анализа флуоресценции**

Для манипуляций с клеточными линиями в стерильных условиях использовали ламинарный бокс 2 класса защиты (ESI-FluFrance), для отслеживания роста культур в ходе культивирования применяли микроскоп Optihot (Nikon), подсчет клеток проводили в гемоцитометре Горяева, для культивирования использовали увлажненный CO<sub>2</sub>-инкубатор.

Электропорацию ES клеток проводили с помощью оборудования для электропорации клеток млекопитающих Lonza Nucleofector.

Для флуоресцентной микроскопии применяли широкопольный флуоресцентный микроскоп Leica AF6000 LX, оборудованный флуоресцентной лампой X-Cite (Lumen Dynamics) и CCD камерой Photometrics CoolSNAP HQ, стандартными наборами фильтров GFP (возбуждение BP470/40, эмиссия BP525/50) и TX2 (возбуждение BP560/40, эмиссия BP645/75), 10 x воздушным объективом и подогреваемой CO<sub>2</sub> камерой.

Для проточной цитофлуориметрии применяли проточный цитофлуориметр Beckman Coulter Cytomics FC500 с лазером с длиной волны 488 нм для возбуждения флуоресценции.

### **2.1.6 Реагенты и оборудование для Вестерн-блоттинга**

Реагенты для SDS-PAGE: раствор 28% акриламида и 2% бисакриламида (Sigma), 10% раствор SDS (Sigma), 0,1 М ЭДТА (Sigma), 1,5 М Трис-HCl буфер с pH 8,8, 0,5 М

Трис-НСl буфер с рН 6,8, 50% раствор глицерина, персульфат аммония (сухой) (Sigma), ТЕМЕД (Sigma), бета-меркаптоэтанол (Sigma), раствор бромфенолового синего. Этанол и уксусная кислота для фиксажа.

Реагенты и расходные материалы для Вестерн-блоттинга: обезжиренное сухое молоко (Applichem), Tween 20 (Sigma), PBS, в качестве субстрата для пероксидазы использовали набор Pierce ECL (Thermo Scientific), проявитель Rapid Access (Kodak), фиксаж AGFA G (Kodak), Ponceau S (Amresco), нитроцеллюлозная мембрана (Helicon), рентгеновская пленка CL-Xposure Film (Thermo Scientific). Маркер молекулярной массы белков PageRuler™ Plus (Thermo Scientific).

Антитела: поликлональные кроличьи антитела против белка UPF1 человека (Antibody-online, ABIN357204), моноклональные мышинные антитела против тубулина человека, клон DM1A (Sigma), вторичные антитела против антител кролика (Thermo Scientific, номер по каталогу A16116) и мыши (Thermo Scientific, номер по каталогу MA5-16781), конъюгированные с пероксидазой хрена.

Оборудование: бумага Whatman 3MM, камера для электрофореза Bio-Rad Mini-Protean Tetra, источник питания Bio-Rad PowerPac HC, камера для блоттинга Mini Trans-Blot (Helicon), лабораторный шейкер S-4 Elmi, градиентный смеситель.

### **2.1.7 Реагенты и оборудование для выделения РНК, синтеза кДНК и количественной ПЦР**

Реагент TRIzol (Gibco/Life Technologies) или набор RNeasy (Qiagen). Концентрацию РНК измеряли с помощью микроспектрофотометра NanoDrop 2000C. Для реакции обратной транскрипции использовали набор MMLV RT (Евроген) Для синтеза библиотек кДНК использовали набор Mint-2 от Евроген. Реакцию ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора Stratagene MX3005 с помощью набора для количественной ПЦР в реальном времени qPCRmix-HS SYBR+ROX от Евроген. Значения порогового цикла Ct определяли с помощью программного обеспечения MxPro (Stratagene).

## 2.2 Методы

### 2.2.1 Получение генетических конструкций

Для оценки активности зависящего от сплайсинга NMD в клетках эукариот были сконструированы репортерные плазмиды pNMD<sup>+</sup> и pNMD<sup>-</sup>. Основой для их конструирования послужил двухпромоторный экспрессионный вектор для клеток эукариот pAqMNavLesZip1, содержащий две идентичные кассеты экспрессии под контролем двух промоторов цитомегаловируса CMV (P<sub>CMV IE</sub>) и двух немедленных ранних сигналов полиаденилирования мРНК вируса SV40. Вектор содержал ряд уникальных сайтов рестрикции для клонирования фрагментов ДНК после первого и второго промоторов CMV.

Вектор pAqMNavLesZip1 линейаризовали эндонуклеазами рестрикции AgeI и BamHI, затем линейаризованный вектор лигировали с обработанным указанными эндонуклеазами рестрикции фрагментом кДНК, кодирующим красный флуоресцентный белок Katushka. Кодированный флуоресцентный белок фрагмент амплифицировали с плазмиды с помощью специфических праймеров 5'-cgctaccggtcgccaccatggtgggtgag и 5'-ggtcggatccgagtcgggattcatccccagtttgc (сайты рестрикции AgeI и BamHI подчеркнуты) с матрицы pTurboFP635-C (Евроген). Клоны трансформантов отбирали с помощью ПЦР-скрининга. Из клонов трансформантов выделяли плазмиды, содержащие кДНК красного флуоресцентного белка.

Выделенную плазмиду NMD-Katushka расщепляли эндонуклеазами рестрикции BglII и NotI. Фрагмент кДНК, кодирующий зеленый флуоресцентный белок GFP, амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров ggtcagatctcgccaccatgagcgggggagcaggagctgttc и gtacaagctttcacctgtacagctctccat (сайты рестрикции BglII и HindIII подчеркнуты) с матрицы pC1TagGFP2 (Евроген). Амплифицированный фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BglII и HindIII. Фрагмент гена β-глобина амплифицировали методом ПЦР с заглубленными праймерами. В качестве матрицы использовали геномную ДНК клеток линии HeLa. Амплификацию проводили в две стадии с внешними геноспецифическими праймерами 5'-gtggtgaggccctgggca и 5'-atgtttttattaggcagaatcc и внутренними геноспецифическими праймерами 5'-gtacaagcttgctgctggtgtctacc и 5'-gttctcccttagcggccggcagaatccagatgctc (сайты рестрикции HindIII и NotI подчеркнуты). Полученный фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции HindIII и NotI. Затем рестрицированный фрагмент кДНК GFP и рестрицированный фрагмент гена β-глобина лигировали в одну стадию с линейаризованной плазмидой NMD-Katushka. Клоны трансформантов отбирали с помощью ПЦР-скрининга.



Выделили экспериментальную плазмиду pNMD<sup>+</sup>. Отсутствие мутаций и соответствие полученной плазмиды схеме клонирования проверяли с помощью секвенирования.

Для получения безинтронного варианта плазмиды pNMD<sup>-(i-)</sup> плазмиду pNMD<sup>+</sup> трансфицировали в клетки HEK293T. На второй день после трансфекции из клеток выделяли суммарную РНК. Для получения образца амплифицированной кДНК использовали набор реактивов MINT (Евроген). Стадии включали синтез первой цепи кДНК с использованием олиго(dT)-содержащего праймера, введение в 3'-конец первой цепи кДНК последовательности адаптера и амплификацию кДНК в ПЦР с праймером, соответствующим внешней части 3'- и 5'-адаптеров. Был получен образец амплифицированной кДНК, соответствующей мРНК из клеток, трансфицированных плазмидой pNMD<sup>+</sup>. С использованием амплифицированной кДНК в качестве матрицы с помощью праймеров 5'-gtacaagcttgctgctgggtctacc и 5'-gttctcccttagcggccgcccagaatccagatgctc (сайты рестрикции HindIII и NotI подчеркнуты) провели ПЦР для получения сплайсированного фрагмента гена β-глобина. Амплифицированный фрагмент расщепляли эндонуклеазами рестрикции HindIII и NotI и лигировали с расщепленной HindIII и NotI плазмидой pNMD<sup>+</sup>. Клоны трансформантов отбирали с помощью ПЦР-скрининга. Отсутствие мутаций и соответствие полученной плазмиды схеме клонирования проверяли с помощью секвенирования.

Также была создана репортерная плазида pNMD<sup>-</sup>, кодирующая устойчивый к NMD вариант кодирующего TagGFP2 транскрипта с делецией в области экзона 1 фрагмента гена β-глобина. Укороченный с 5'-конца фрагмент гена β-глобина амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров 5'-gtacaagcttgctgacaagctgcacgtgg и 5'-gttctcccttagcggccgcccagaatccagatgctc (сайты рестрикции HindIII и NotI подчеркнуты), используя плазмиду pNMD<sup>+</sup> в качестве матрицы. Амплифицированный фрагмент расщепляли эндонуклеазами рестрикции HindIII и NotI и лигировали с расщепленной HindIII и NotI плазмидой pNMD<sup>+</sup>, клоны трансформантов отбирали с помощью ПЦР-скрининга, отсутствие мутаций и соответствие полученной плазмиды схеме клонирования проверяли с помощью секвенирования.

Таким образом, были получены плазмиды pNMD<sup>+</sup>, pNMD<sup>-</sup> и pNMD<sup>-(i-)</sup>.

Для оценки активности независимого от сплайсинга NMD в клетках эукариот были сконструированы репортерные плазмиды pSMG5-NMD<sup>+</sup> и pTRAM1-NMD<sup>-</sup>. Полноразмерные 3'-нетранслируемые области транскриптов SMG5 и TRAM1, включающие всю последовательность 3'-НТО от стоп кодона до сигнала полиаденилирования, амплифицировали с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы

библиотеку кДНК из человеческого мозга. Фрагмент человеческого гена SMG5 (NM\_015327.2) длиной 1364 bp амплифицировали с использованием праймеров 5'-ttaaagcttactgacccccaggccc и 5'-ttaagcgccgcgggcttggggggttattaa. Амплифицированный фрагмент расщепляли эндонуклеазами рестрикции HindIII и NotI и лигировали с расщепленной HindIII и NotI плазмидой pNMD+, получая вектор pSMG5-NMD+. Контрольную репортерную конструкцию pTRAM1-NMD- получали сходным образом. Фрагмент человеческого гена TRAM1 (NM\_014294.5) длиной 1714 bp амплифицировали с использованием праймеров 5'-aattaagcttgaattataaactaattgattaatgt и 5'-aattgcggccgcgtagtttaaccagtgattccag. Амплифицированный фрагмент расщепляли эндонуклеазами рестрикции HindIII и NotI и лигировали с расщепленной HindIII и NotI плазмидой pNMD+. Отсутствие мутаций и соответствие полученной плазмиды схеме клонирования проверяли с помощью секвенирования.

Таким образом, в репортерных конструкциях pSMG5-NMD+ и pTRAM1-NMD- фрагмент гена  $\beta$ -глобина исходного вектора pNMD+ был заменен на фрагменты транскриптов SMG5 и TRAM1, соответственно.

Для нокаута гена UPF1 конструировали плазмиду pshUPF1. В качестве исходного вектора использовали вектор pGreenPuro, из которого сначала вырезали последовательность, кодирующую зеленый флуоресцентный белок copGFP, используя сайты рестрикции XbaI и PstI. Линеаризованный вектор обрабатывали фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I для затупления полученных липких концов и полученные тупые концы лигировали с получением контрольного вектора shControl. При этом также нарушалась экспрессия селективного маркера устойчивости к пуромицину, который был предусмотрен в исходном векторе в качестве белка слияния с copGFP. В полученный вектор затем вставляли последовательность, кодирующую короткую шпилечную РНК против UPF1. Для этого вектор расщепляли эндонуклеазами рестрикции BamHI и EcoRI и линеаризованный вектор лигировали с химически синтезированным двухцепочечным олигонуклеотидом, несущим соответствующие липкие концы. В качестве последовательности-мишени в транскрипте hUPF1 использовали последовательность 5'-gagaatcgctacttcaact [136]. Также получали вектор pGreenPuroUPF путем вставки последовательности, кодирующей короткую шпилечную РНК против UPF1, непосредственно в вектор pGreenPuro по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI. При этом вектор сохранял функциональную кассету, опосредующую экспрессию copGFP, слитого с пуромицин-ацетилтрансферазой.

Для оценки способности полученного вектора подавлять экспрессию транскрипта-мишени был сконструирован флуоресцентный репортер mKate-upf1. Для этого фрагмент человеческого гена UPF1, содержащий последовательность-мишень GAGAATCGCCTACTTCACT, амплифицировали с использованием праймеров gatcagatcttaaggacgaggagccgcagc (сайт рестрикции BglIII подчеркнут, стоп-кодон выделен жирным шрифтом) и cggсааасgtttcaatgсg. В качестве матрицы использовали библиотеку кДНК из человеческого мозга. Амплифицированный фрагмент расщепляли эндонуклеазами рестрикции BglIII и SalI (сайт рестрикции SalI содержался в нативной последовательности гена hUPF1) и лигировали с расщепленной BglIII и SalI плазмидой pmKate2-C после фрагмента ДНК, кодирующего красный флуоресцентный белок mKate2, так что стоп-кодон находился в рамке считывания с последовательностью mKate2 до фрагмента гена hUPF1.

Плазмиду pSplPIG конструировали на основе вектора pTurboFP635-C (Евроген) для экспрессии дальне-красного флуоресцентного белка Katushka в клетках млекопитающих. Кодированный TagGFP фрагмент амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров 5'-ggatgtcgacgtgaatagcggggcgaggagctg и 5'-ggatagatctcctgtacagctcgccatgсc (сайты рестрикции SalI и BglIII подчеркнуты) и вставляли по соответствующим сайтам (SalI и BamHI) в вектор pTurboFP635-C. Полученный вектор Katushka-TagGFP содержал полилинкер между фрагментами, кодирующими Katushka и TagGFP, включающий сайты рестрикции BglIII и SalI.

Миниген PIG3 получали с помощью ПЦР-амплификации экзонов 3–5 и соответствующих интронов гена PIG3, используя в качестве матрицы геномную ДНК HeLa, с помощью праймеров 5'-tcgcagatctccggaaatgttcaggctggagactat и 5'-ggatgtcgaccgtctggggcagttccaggacg. Полученный продукт ПЦР-амплификации (3,6 kb) клонировали в вектор Katushka-TagGFP с использованием сайтов BglIII и SalI.

Для получения конструкции pCtrlPIG фрагмент кДНК гена PIG3, соответствующий экзонам 3–5, длиной 592 bp амплифицировали с использованием тех же праймеров для pSplPIG с матрицы кДНК из клеток HeLa. Полученный фрагмент клонировали в вектор Katushka-TagGFP с использованием сайтов BglIII и SalI.

### 2.2.2 Культивирование и трансфекция клеточных линий HEK и HeLa

Полученные репортерные плазмиды pSplPIG, pCtrlPIG, pNMD<sup>+</sup> и pNMD<sup>-</sup>, а также pSMG5-NMD<sup>+</sup> и pTRAM1-NMD<sup>-</sup> трансфицировали в клетки линий HEK293T и HeLa Kyoto.

Линии клеток HEK293T и HeLa Kyoto культивировали в среде DMEM (PanEco), дополненной 10% FBS (Sigma) и пенициллином-стрептомицином (PanEco) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в увлажненном инкубаторе. Клетки пересаживали каждые 2-3 дня с использованием 0,25% раствора трипсин-ЭДТА.

Для трансфекции клетки высевали в культуральные чашки диаметром 3,5 см с пластиковым дном в среду DMEM при плотности примерно  $2 \times 10^4$  клеток на чашку. Через 24 часа клетки трансфицировали репортерными плазмидами с использованием реагента FuGene 6 (Roche) согласно рекомендациям производителя. Для этого смешивали 3 мкл катионного липофильного реагента для трансфекции и 100 мкл среды для трансфекции Opti-MEM, смесь осторожно перемешивали и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 1 мкг очищенной для трансфекции ДНК, смесь повторно осторожно перемешивали и инкубацию для образования комплексов проводили дополнительно в течение 25 минут. Затем трансфекционную смесь добавляли к клеткам и инкубировали в течение ночи. На следующий день или перед добавлением ингибиторов NMD среду DMEM заменяли свежей.

Соотношение зеленого и красного флуоресцентного сигналов клеток анализировали методом флуоресцентной микроскопии или проточной цитофлуориметрии через 24–48 часов после трансфекции. Оценивали падение зеленой флуоресценции в трансфицированных плазмидой NMD(+) или pSMG5-NMD<sup>+</sup> клетках по сравнению с трансфицированными контрольной плазмидой pNMD<sup>-</sup> или pTRAM1-NMD<sup>-</sup> клетками.

### 2.2.3 Культивирование и трансфекция первичных клеток MEF и ES

Мышиные эмбриональные стволовые (ES) клетки поддерживали *in vitro* в состоянии плюрипотентных стволовых клеток с использованием реагентов Millipore в соответствии со стандартным протоколом [138].

Кратко, линию мышинных эмбриональных стволовых (ES) клеток СТМ1-2 (Millipore) культивировали в полной среде для роста ES клеток (DMEM с 15% FBS) на слое мышинных эмбриональных фибробластов (MEF), инактивированных митомицином-С

(Sigma), в качестве фидерных клеток в присутствии цитокина ингибирующего лейкемию фактора (LIF) (ESGRO от Chemicon). Среду меняли каждый день, причем одновременно заменяли не более 2/3 среды, чтобы избежать истощения ростовых факторов. Клетки регулярно пересаживали, не позволяя клеткам достичь высокой плотности. Для транзистных трансфекций плазмидную ДНК очищали с использованием набора QIAGEN Plasmid Midi в соответствии с инструкциями производителя. Клетки ES пересаживали за 1 день трансфекции для получения активно делящихся клеток. Все растворы были предварительно нагреты до 37°C. Затем клетки обрабатывали трипсином при 37°C и два раза промывали PBS. Для электропорации использовали приблизительно  $2 \times 10^6$  клеток. После промывания клетки осаждали центрифугированием в 1,5 мл пробирках Eppendorf для полного удаления PBS. Затем клетки осторожно ресуспендировали в 90 мкл раствора Mouse ES Cell Nucleofector® Solution и к полученной суспензии клеток добавляли 10 мкг плазмидной ДНК в 10 мкл деионизированной воды. Затем клетки переносили с помощью одноразовой пластиковой пипетки, предусмотренной в наборе для электропорации, в одноразовые стерильные кюветы для электропорации Аmaxa. Для электропорации использовали записанные в памяти прибора для электропорации Lonza Nucleofector программы A-23\*/A-023\*\* и A-30\*/A-030\*\*. Обе программы давали приблизительно одинаковую эффективность трансфекции. Немедленно после электропорации в кювету с клетками добавляли 0,5 мл предварительно нагретой до 37°C среды для культивирования и суспензию клеток переносили в чашку со средой и слоем обработанных митомицином С фидерных клеток MEF. Клетки культивировали в течение 2-3 дней после электропорации, а затем подвергали флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Для анализа методом проточной цитофлуориметрии мы использовали смесь трипсинизированных клеток ES и инактивированных MEF. В качестве дополнительного отрицательного контроля использовали образец инактивированных клеток MEF.

Клетки MEF культивировали в среде DMEM с высоким уровнем глюкозы в присутствии 15% FBS. Транзистную трансфекцию клеток MEF проводили, как описано для клеток ES выше, с использованием программы A-23\*/A-023 для электропорации.

#### **2.2.4 Флуоресцентная микроскопия**

Для оценки уровня флуоресцентных сигналов трансфицированных репортерными плазидами клеток микроскопирование проводили на микроскопе Leica AF6000 LX в 35 мм чашках с пластиковым дном при увеличении 10 х, оценивая флуоресценцию в зеленом и красном каналах с помощью стандартного набора фильтров GFP (возбуждение

BP470/40, эмиссия BP525/50) и TX2 (возбуждение BP560/40, эмиссия BP645/75). Съемку проводили в одинаковых условиях экспозиции и интенсивности возбуждающего света для каждой пары репортерных плазмид. Микроскопирование клеток ES и MEF проводили при 37°C.

### **2.2.5 Проточная цитометрия**

Для анализа флуоресценции клеток методом проточной цитофлуориметрии живые трансфицированные клетки трипсинизировали и осаждали центрифугированием, после чего раствор трипсина-ЭДТА отбирали и клетки тщательно ресуспендировали в растворе Версена. Суспензию клеток пропускали через клеточное сито на 70 мкм и переносили в пробирки для цитометрии.

В ходе анализа на проточном цитофлуориметре Beckman Coulter Cytomics FC500 сначала оценивали боковое и прямое светорассеяние трансфицированных плазмидами клеток, отбирая для дальнейшего исследования клетки с оптимальной структурой. Флуоресценцию детектировали в зеленом (FL1, 510–540 нм) и красном (FL4, 660–690 нм) каналах при длине волны возбуждающего света 488 нм. Для контроля того, что при используемых параметрах измерения флуоресцентный сигнал зеленого флуоресцентного белка TagGFP2 не регистрируется в красном канале FL4, а флуоресцентный сигнал красного флуоресцентного белка Katushka не регистрируется в зеленом канале FL1, использовали клетки, экспрессирующие только Katushka (трансфекция клеток HEK293 вектором pTurboFP635-N) или только TagGFP2 (трансфекция клеток HEK293 вектором pTagGFP2-N). Подобранные значения усиления для каналов FL1 и FL4 и компенсаций вносили в память цитофлуориметра в виде сохраненного протокола измерения и использовали их для всех последующих измерений.

### **2.2.6 Вестерн-блоттинг**

Клетки HEK293 трипсинизировали, осаждали центрифугированием и лизировали напрямую в буфере для образцов с SDS, после чего полученные образцы прогревали при 99°C в течение 5 минут, разделяли на аликвоты и хранили в замороженном состоянии до анализа. Образцы готовили из расчета  $10^5$  клеток на 10 мкл образца, для этого клетки после трипсинизации подсчитывали в гемоцитометре Горяева. Перед нанесением в гель образцы центрифугировали для осаждения нерастворенных частиц.

Образцы разделяли в 10-20% градиентных гелях для SDS-PAGE. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали поликлональными кроличьими антителами против белка UPF1 человека (Antibody-online) и моноклональными мышинными антителами против тубулина человека (Sigma). Для детекции использовали вторичные антитела против кроличьих и мышинных антител, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma), и стандартный хемилюминисцентный метод с люминолом и перборатом.

### **2.2.7 Нокаут эндогенного UPF1 с помощью кшРНК в культуре клеток**

Эксперименты по нокауту ключевого для активности NMD фактора UPF1 проводили с помощью РНК-интерференции. Для этого использовали кшРНК, экспрессируемые с вектора pshUPF1, сконструированного, как описано выше. В качестве контроля использовали вектор shControl, сконструированный, как описано выше.

Для оценки способности сконструированного вектора подавлять экспрессию транскрипта-мишени плазмиды pshUPF и shControl ко-трансфицировали с репортерным вектором mKate-upf1 в клетки HEK293 в соотношении 1:1. Через 48 часов после трансфекции уровень флуоресценции репортерного белка mKate2 в клетках оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии с детекцией флуоресценции в канале FL4, как описано выше.

Для тестирования репортерных конструкций при ингибировании NMD с помощью нокаута UPF1 клетки HEK293T ко-трансфицировали репортерными плазмидами pNMD<sup>+</sup> и pNMD<sup>-</sup> или pSMG5-NMD<sup>+</sup> и pTRAM1-NMD<sup>-</sup> совместно с плазмидами shUPF1 или shControl и культивировали в течение 6 дней. При трансфекции использовали 3-кратный молярный избыток плазмид shUPF1 и shControl, суммарное количество плазмид составляло 2 мкг ДНК на трансфекцию (концентрации плазмид были определены с помощью микроспектрофотометра NanoDrop 2000C и пересчитаны в молярное отношение с учетом размера используемых генетических конструкций), причем для повышения эффективности трансфекции использовали избыток трансфекционного реагента FuGene 6 (9 мкл на трансфекцию). После трансфекции клетки регулярно пересаживали, чтобы не допустить образования монослоя клеток.

Для прямой оценки деплеции белка hUPF1 в культуре клеток под действием используемой в работе кшРНК методом Вестерн-блоттинг клетки HEK293T трансфицировали плазмидами pGreenPuroUPF и pGreenPuro (контроль). Для трансфекции

использовали 3 мкг плазмидной ДНК и 9 мкл трансфекционного реагента FuGene 6 на стандартную 35 мм культуральную чашку с примерно  $10^5$  клетками HEK293T. Измененные условия трансфекции позволили добиться высокой эффективности трансфекции. Для удаления нетрансфицированных клеток после трансфекции клетки культивировали в течение 7 дней в присутствии 2 мкг/мл пурамицина. Процент трансфекции оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии по флуоресцентному сигналу сорGFP. После 7 дней культивирования клетки собирали и получали образцы для оценки деплеции hUPF1 методом Вестерн-блоттинг, как описано выше.

### **2.2.8 Выделение РНК, получение кДНК и количественная ОТ-ПЦР в реальном времени**

Общую РНК выделяли из образцов культур клеток млекопитающих с помощью реагента TRIzol (Gibco/Life Technologies) или наборов RNeasy (Qiagen). Клетки, собранные с культуральных чашек с помощью обработки раствором трипсина или раствором Версена, осаждали центрифугированием и к осадку добавляли 100-300 мкл реагента TRIzol. Далее выделение общей РНК проводили согласно стандартной методике. Целостность препарата РНК после выделения проверяли с помощью гель-электрофореза в 1,2% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Концентрацию РНК измеряли с помощью микроспектрофотометра NanoDrop 2000C. Образцы общей РНК хранили в виде раствора в деионизированной воде при  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Для каждой реакции обратной транскрипции использовали 3 микрограмма общей РНК, выделенной из трансфицированных клеток, как описано выше. Перед отбором образца РНК замороженный образец прогревали при  $50^{\circ}\text{C}$  в течение 2 минут для равномерного растворения образца РНК и тщательно перемешивали на вортексе. Реакцию проводили с помощью набора MMLV RT (Евроген) с использованием олиго(dT)<sub>20</sub> праймера для отжига на полиА-последовательность мРНК. Реакцию проводили в соответствии с инструкциями производителя. Полученный образец кДНК немедленно использовали для синтеза библиотек кДНК или хранили при  $-18^{\circ}\text{C}$ . Для синтеза библиотек кДНК использовали набор Mint-2 от Евроген в соответствии с инструкциями производителя.

Для количественной ПЦР в реальном времени использовали образцы кДНК или библиотек кДНК. Реакцию ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора Stratagene MX3005 с помощью набора для количественной ПЦР в



реальном времени qPCRmix-HS SYBR+ROX от Евроген. Реакцию проводили в соответствии с инструкциями производителя. Для каждой экспериментальной точки реакцию проводили в трех повторах, усредняя полученные значения порогового цикла  $C_t$ . Образцы надлежащим образом разбавляли перед добавлением в реакционную смесь, добиваясь значения  $C_t$  в интервале 25-30 циклов амплификации. После реакции амплификации аутентичность амплифицированных фрагментов проверяли, исследуя длину продуктов реакции амплификации с помощью гель-электрофореза в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Представленность кодирующих белки TagGFP2 и Katushka транскриптов определяли с использованием праймеров 5'-cgccatcagcaaggaccg и 5'-actggtgggtcaattctttgc для транскрипта, кодирующего белок TagGFP2 и 5'-tgagagcggattgacaggccat и 5'-gagtcggattgatccccagtttgc для транскрипта, кодирующего белок Katushka. Праймеры подбирали таким образом, чтобы длина амплифицируемых фрагментов составляла 150-250 нуклеотидов, кроме того, праймеры для амплификации фрагмента транскрипта, кодирующего TagGFP2 конструировали таким образом, чтобы один праймер отжигался на кДНК TagGFP2, а второй – на область первого экзона фрагмента гена  $\beta$ -глобина. Конечная концентрация каждого праймера в реакции составляла 0,2 мкМ. Для каждого образца уровень транскрипта, кодирующего белок TagGFP2, нормализовали на уровень транскрипта, кодирующего белок Katushka. Праймеры 5'-cgctaccggactccag и 5'-caagttaacaasaacaattgc, отжигающиеся непосредственно в начале транскрипта, кодирующего TagGFP2, и в его конце перед сигналом полиаденилирования, использовали для контроля присутствия несплайсированных или альтернативно сплайсированных форм транскрипта, кодирующего TagGFP2. Образцы исходной РНК использовали в ПЦР-реакции для контроля загрязнения образца РНК плазмидной ДНК репортера.

Для количественного определения относительной представленности полноразмерного и укороченного транскриптов, экспрессирующихся с репортера pSpPIG, использовали праймеры 5'-cttgagcagctgctggattc и 5'-tccgtggagaagtgaggcagaa.

Количественное определение относительной представленности транскриптов в образце проводили методом денситометрии интенсивности окраски полос, соответствующих продуктам ПЦР-амплификации целевых транскриптов, в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием. Интенсивности полос определяли с помощью программного обеспечения Photoshop 10 за вычетом интенсивности фонового окрашивания геля и нормировали на длину транскриптов.

### 2.2.9 Обработка клеточных линий известными ингибиторами NMD и оценка стабильности РНК сенсора

Для тестирования созданных репортеров применяли известные низкомолекулярные ингибиторы NMD: вортманнин, кофеин [131] и циклогексимид. [139].

Для оценки эффекта вортманнина клетки НЕК293Т трансфицировали репортерными плазмидами в культуральных чашках, как описано выше. Через 14 часов после трансфекции в среду DMEM, в которой росли клетки, добавляли вортманнин (Sigma) в виде раствора в ДМСО до конечной концентрации 20 мкМ. Действие вортманнина косвенно оценивали, наблюдая морфологию клеток и степень прикрепленности клеток к субстрату в световой микроскоп. До сбора клеток с чашек ингибиторный эффект также оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии, как описано выше. Через 8 часов инкубации среду удаляли, слабо прикрепленные из-за действия вортманнина клетки собирали промыванием культуральных чашек раствором Версена и подвергали анализу методом проточной цитофлуориметрии. В качестве контроля трансфицированные обеими репортерными плазмидами клетки обрабатывали равным объемом ДМСО.

Для оценки эффекта кофеина клетки НЕК293Т трансфицировали репортерными плазмидами в культуральных чашках, как описано выше. На следующий день после трансфекции среду DMEM заменяли на 2 мл заранее приготовленной среды DMEM, дополненной 10 мМ кофеина (Sigma). Для приготовления этой среды навеску кофеина растворяли непосредственно в среде, после чего приготовленную среду стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,22 мкм. Среду с кофеином заменяли на новую порцию 2 мл среды через 4-5 часов и затем заменяли второй раз на следующий день утром. Инкубацию с кофеином продолжали в общей сложности в течение 24 часов. Действие кофеина косвенно оценивали, наблюдая морфологию клеток и степень прикрепленности клеток к субстрату в световой микроскоп. До сбора клеток с чашек ингибиторный эффект также оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии, как описано выше. Через 24 часа инкубации среду удаляли, слабо прикрепленные клетки собирали промыванием культуральных чашек раствором Версена и подвергали анализу методом проточной цитофлуориметрии и количественной ОТ-ПЦР. Образец собранных клеток разделяли на две части: 2/3 клеток использовали для выделения РНК для последующего анализа ОТ-ПЦР, как описано выше, а 1/3 клеток анализировали методом проточной цитометрии. В качестве контроля использовали трансфицированные обеими репортерными плазмидами

клетки, которые культивировали 48 часов после трансфекции без кофеина со сменой среды на 2 мл свежей среды DMEM через 24 часа после трансфекции.

Эксперимент с циклогексимидом проводили следующим образом. Клетки HEK293T трансфицировали репортерными плазмидами в культуральных чашках, как описано выше. Через 4 часа после трансфекции среду заменяли на 2 мл свежей среды DMEM и к трансфицированным клеткам добавляли раствор циклогексимид (Sigma) в ДМСО до конечной концентрации 30 мкг/мл циклогексимид. В качестве контроля трансфицированные обеими репортерными плазмидами клетки обрабатывали равным объемом ДМСО. Через 6 часов инкубации с циклогексимидом среду удаляли и клетки собирали с культуральных чашек с помощью обработки раствором трипсина в растворе Версена. Далее клетки осаждали центрифугированием, выделяли РНК и проводили количественный ОТ-ПЦР анализ, как описано выше.

Для оценки стабильности РНК, которая транслируется с репортных конструкций, и дестабилизации РНК химерного гена, являющегося мишенью NMD, по сравнению с химерным геном, не являющимся мишенью NMD, был использован ингибитор трансляции актиномицин Д. Чтобы показать, что дестабилизация одного из транскриптов обусловлена именно активностью NMD, применяли совместную обработку трансфицированных репортерными клетками актиномицином Д и ингибитором NMD циклогексимидом. Клетки HEK293T трансфицировали репортерными плазмидами в культуральных чашках, как описано выше. Через 4 часа после трансфекции среду заменяли на 2 мл свежей среды DMEM и к трансфицированным клеткам добавляли раствор актиномицина Д в деионизированной воде (AMD, Sigma) до конечной концентрации 5 мкг/мл или растворы актиномицина Д (AMD, Sigma) и циклогексимид (Sigma) в ДМСО до конечной концентрации 5 мкг/мл и 30 мкг/мл, соответственно. В качестве контроля трансфицированные обеими репортерными плазмидами клетки обрабатывали равным объемом ДМСО. Клетки инкубировали в течение 1 часа, затем среду удаляли и клетки собирали с культуральных чашек с помощью обработки раствором трипсина в растворе Версена. Далее клетки осаждали центрифугированием, выделяли РНК и проводили количественный ОТ-ПЦР анализ, как описано выше.

#### **2.2.10 Работа с трансгенными эмбрионами *Xenopus laevis***

Трансгенные эмбрионы, несущие конструкции pNMD<sup>+</sup> и pNMD<sup>-</sup>, получали по методике REMI, как описано ранее [140]. Кратко, плазмиды pNMD<sup>+</sup> и pNMD<sup>-</sup>

линеаризовали с помощью рестриктазы Tth111I, очищали с помощью экстракции фенолом/хлороформом с последующим трехкратным переосаждением этанолом, смешивали с экстрактом ооцитов и ядрами сперматозоидов и инъецировали свежую икру *Xenopus laevis*. Трансгенные эмбрионы отбирали по флуоресценции с помощью флуоресцентного стереомикроскопа Leica M205 в начале стадии нейруляции (стадия 13).

Микрофотографии отобранных трансгенных эмбрионов получали с помощью того же флуоресцентного микроскопа, оборудованного цифровой камерой Leica DFC420C. Интенсивности флуоресценции в тканях эмбрионов определяли с помощью программного обеспечения Adobe Photoshop. Для вычисления значений отношения интенсивностей флуоресценции в зеленом и красном каналах использовали значения интенсивности флуоресценции за вычетом фоновых значений. Для количественного измерения активности NMD использовали разницу между отношениями интенсивностей флуоресценции в зеленом и красном каналах в трансгенных эмбрионах pNMD+ и pNMD- на одной стадии развития (отношение NMD+/NMD-).

Для подавления экспрессии UPF1 использовали антисмысловые морфолино олигонуклеотиды (МО), комплементарные мРНК обоих псевдоаллельных вариантов UPF1 *Xenopus laevis*, и контрольный misUPF1 МО от Gene Tools LLC:

UPF1 МО 59-ctcattgtaatggccgaagacag;

misUPF1 МО 59-cttagtgtaatagcagaatagaag (некомплементарные основания выделены подчеркиванием).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Использование пары флуоресцентных белков TagGFP2 и Katushka для мониторинга процессинга РНК *in vivo*

Мы исследовали возможность применения пары флуоресцентных белков TagGFP2 и Katushka для отслеживания различных аспектов процессинга мРНК. Для исследования указанных процессов на уровне мРНК мы применяли подход конструирования репортерных минигенов, в которых последовательности, кодирующие флуоресцентные белки, были функционально соединены с фрагментами эукариотических генов, позволяя отслеживать процессинг или деградацию мРНК по флуоресценции репортера. Один из флуоресцентных белков служил для нормирования уровня экспрессии репортера, а сигнал второго изменялся в зависимости от происходящих изменений на уровне мРНК, в результате чего измеряемое соотношение интенсивностей флуоресцентных сигналов в двух каналах флуоресценции позволяло судить об активности того или иного процесса. В качестве контроля при таком подходе необходимо сконструировать контрольную репортерную конструкцию, на флуоресценцию которой исследуемый процесс не оказывает влияния, обеспечивающую базовое соотношение интенсивностей флуоресценции в зеленом и красном каналах.

Сначала мы использовали данный подход для отслеживания процесса сплайсинга на уровне отдельных клеток. В данном методе вырезание альтернативно сплайсируемого экзона или его включения в зрелый транскрипт приводит к сдвигу рамки считывания (то есть длина экзона не кратна 3). В репортерной конструкции фрагмент целевого гена (миниген), состоящий из интересующего альтернативного экзона (AEn), фланкированного расположенными до и после него интронами (I) и конститутивными экзонами (E), клонировали между последовательностями, кодирующими зеленый флуоресцентный белок и красный флуоресцентный белок в следующем порядке: Katushka-E(n-1)-I(n-1)-AEn-I(n)-E(n+1)-TagGFP2 (Рисунок 3.2) с сохранением ОРС от стартового кодона Katushka до стоп-кодона TagGFP2. Таким образом, трансляция полноразмерного транскрипта в случае нормального сплайсинга приводила к белку слияния Katushka-ОРС-TagGFP2. Напротив, вырезание альтернативного экзона приводило к сдвигу рамки считывания в экзоне E(n+1) и появлению стоп-кодона перед последовательностью, кодирующей TagGFP2, что давало укороченный белок Katushka-ОРС.

Основной отличительной чертой этого подхода является то, что красный флуоресцентный белок Katushka кодируется нормальным и альтернативным

транскриптами. Это позволяет количественно оценить соотношение альтернативного и нормального транскриптов в отдельных клетках, разделяя сигнал флуоресценции в красном канале на две части, соответствующие альтернативному (экспрессия *Katushka*) и нормальному (экспрессия *Katushka+TagGFP2*) транскриптам, с помощью базового соотношения зеленый сигнал/красный сигнал, обеспечиваемого контрольной конструкцией (экспрессия *Katushka+TagGFP2*).

Клетки, экспрессирующие репортерную конструкцию, имеют различный уровень флуоресценции в зеленом и красном каналах, которые можно количественно измерить с использованием флуоресцентной микроскопии или проточной цитофлуориметрии, и отношение интенсивностей флуоресценции в зеленом и красном каналах можно использовать для оценки соотношения нормального и альтернативного транскриптов. Для установления базового уровня соотношения интенсивностей флуоресценции в двух каналах была создана контрольная конструкция *Katushka-OPC-TagGFP2* без интронов, имитирующая транскрипт, претерпевший нормальный сплайсинг. Экспрессия этой контрольной плазмиды давала базовое соотношение интенсивностей флуоресценции в зеленом и красном каналах для конкретной биологической модели и параметров детекции, когда в образце присутствует нормальный транскрипт. В случае, если репортерный транскрипт претерпевает альтернативный сплайсинг, интенсивность сигнала в красном канале возрастает и соотношение интенсивностей сигналов превышает базовое отношение.

Результаты анализа можно представить в виде графика в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом и красном каналах, на котором каждая клетка представлена точкой с конкретными значениями интенсивностей флуоресценции в двух каналах (Рисунок 3.1). На этом графике трансфицированные контрольной плазмидой клетки будут группироваться в диагональной области, в то время как клетки, трансфицированные репортерной сплайсируемой конструкцией, будут лежать в пределах диагональной области или выше нее. Соотношение нормальных и альтернативных транскриптов в каждой клетке можно оценить с использованием простого вычисления на основе интенсивности флуоресценции клетки в красном канале относительно интенсивности флуоресценции для клеток, лежащих в диагональной области (Рисунок 3.1).

Чтобы протестировать данный метод, мы оценивали альтернативный сплайсинг человеческого гена *PIG3* (*p53-inducible gene 3*). Транскрипт этого гена претерпевает альтернативный сплайсинг, давая два варианта сплайсинга: основная полноразмерная

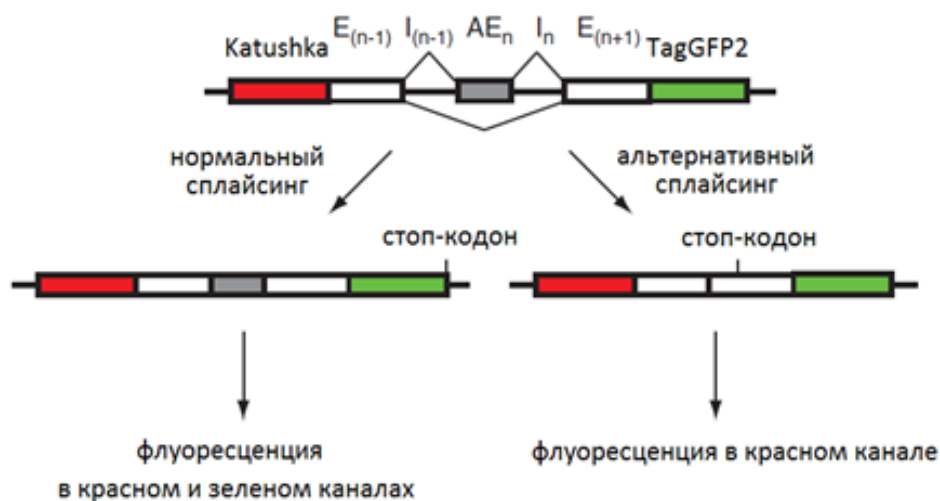
форма, включающая все 5 экзонов, и минорная укороченная форма, в которой отсутствует экзон 4 длиной 197 bp [141]. Отсутствие экзона 4 вызывает сдвиг рамки считывания в экзоне 5.

Мы использовали дальне-красный флуоресцентный белок *Katushka* и зеленый флуоресцентный белок *TagGFP*, которые дают яркие и хорошо спектрально различимые флуоресцентные сигналы. Ранее было показано, что кДНК *Katushka* содержит сильный донорный сайт сплайсинга, который может изменить сплайсинг исследуемого гена [142]. Поэтому в работе использовали мутированный вариант *Katushka* без донорного сайта сплайсинга [142].

Миниген *PIG3* (экзоны 3–5 и интроны между ними) клонировали между последовательностями, кодирующими флуоресцентные белки *Katushka* и *TagGFP* (конструкция *pSp1PIG*), как показано на Рисунке 3.2. Также конструировали контрольную плазмиду *pCtrlPIG*, соответствующую нормально сплайсируемому транскрипту (*Katushka*-экзоны 3–5-*TagGFP*).



**Рисунок 3.1.** Схема предложенного метода анализа альтернативного сплайсинга с помощью двух флуоресцентных белков. Схематичное изображение ожидаемых результатов при анализе трансфицированных клеток методом проточной цитофлуориметрии (график в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом и красном каналах). Отмеченная серым цветом область показывает трансфицированные контрольной плазмидой клетки, экспрессирующие нормальный транскрипт без интронов. Клетки, в которых проходит только нормальный сплайсинг, только альтернативный сплайсинг или оба типа сплайсинга исследуемого гена, показаны желтыми красными и оранжевыми точками, соответственно. Процент нормальных и альтернативных транскриптов в каждой клетке может быть рассчитан с помощью приведенного уравнения.



**Рисунок 3.2.** Схема предложенного метода анализа альтернативного сплайсинга с помощью двух флуоресцентных белков. Схематичное изображение репортера, который включает фрагмент целевого гена (альтернативно сплайсируемый экзон с прилегающими к нему интронами и конститутивными экзонами), фланкированный последовательностями, кодирующими флуоресцентные белки TagGFP2 и Katushka. Альтернативный сплайсинг приводит к двум вариантам транскриптов. Трансляция нормального полноразмерного транскрипта (слева) дает TagGFP2 и Katushka, а трансляция альтернативно сплайсированного укороченного транскрипта (справа) дает только красный флуоресцентный белок Katushka.

Клетки HEK293T трансфицировали плазмидами pSplPIG и pCtrlPIG и анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Клетки, экспрессирующие контрольную конструкцию pCtrlPIG, обладали яркой зеленой и красной флуоресценцией, отношение интенсивностей флуоресценции в зеленом и красном каналах сильно не варьировало от клетки к клетке. Анализ методом проточной цитофлуориметрии показал, что клетки группируются в достаточно узкой диагональной области в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом и красном каналах (Рисунок 3.3)

Напротив, трансфекция клеток репортерной конструкцией pSplPIG показала неожиданный разброс интенсивностей флуоресценции в зеленом и красном каналах от клетки к клетке. Анализ клеток, экспрессирующих pSplPIG и pCtrlPIG при одинаковых настройках показал гетерогенность клеток, трансфицированных pSplPIG: некоторые клетки имели флуоресценцию, аналогичную клеткам, трансфицированным контрольной плазмидой, другие клетки обладали практически только красной флуоресценцией, большинство клеток имели различные промежуточные интенсивности флуоресценции в зеленом и красном каналах (с повышением сигнала в красном канале относительно зеленого канала по сравнению с клетками, трансфицированными pCtrlPIG) (Рисунок 3.3).

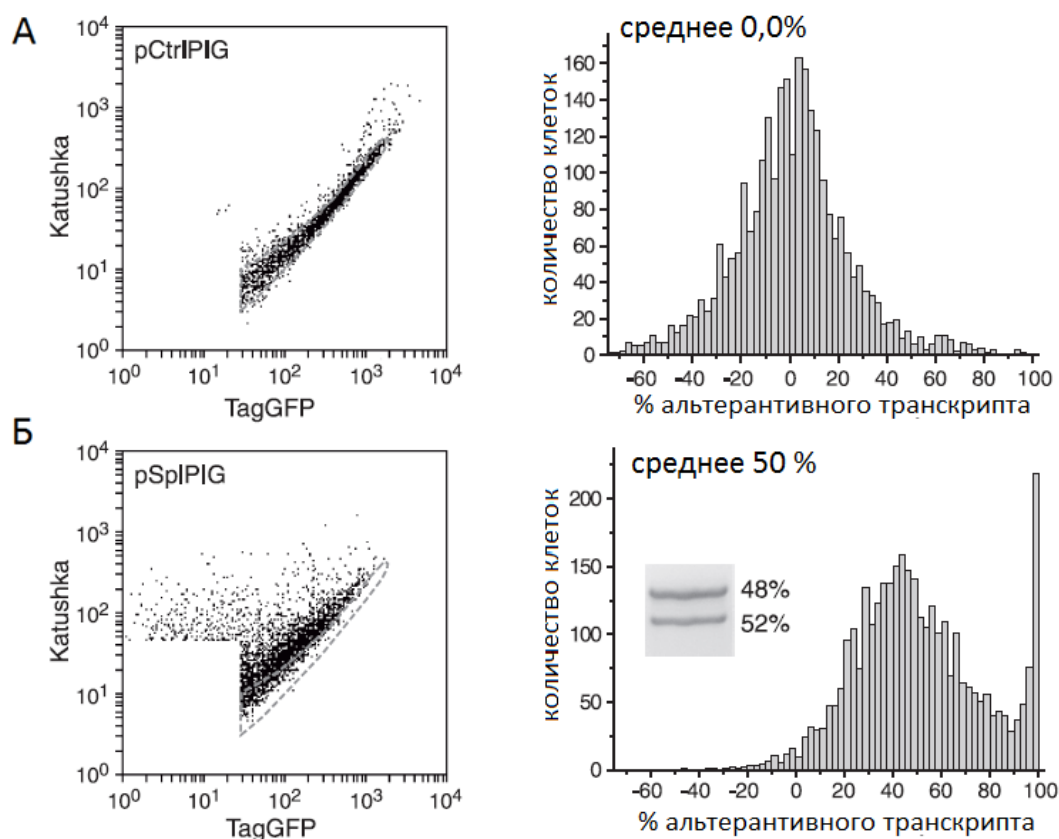


Данные показывают, что уровень альтернативного сплайсинга минигена PIG3 в отдельных клетках HEK293T может значительно варьировать от почти 100% нормального транскрипта (клетки в диагональной области pCtrlPIG) до почти 100% альтернативного транскрипта (клетки в «красной» области), но большая часть клеток характеризуется наличием обоих транскриптов в различных пропорциях.

Количественный анализ данных, полученных методом проточной цитофлуориметрии, подтвердил широкий разброс отношения уровней нормального и альтернативного транскриптов в клетках, трансфицированных репортерной конструкцией pSplPIG (Рисунок 3.3). Были различимы два пика, соответствующие двум популяциям клеток HEK293T с примерно 45% и > 95% альтернативного транскрипта. Средний процент альтернативного транскрипта pSplPIG во всей популяции клеток составлял 50%. Для подтверждения этого показателя независимым методом, мы выделяли РНК из клеток HEK293T, трансфицированных pSplPIG, синтезировали кДНК и проводили ПЦР с праймерами, отжигающимися на концевые участки последовательностей, кодирующих Katushka и TagGFP. Как и ожидалось, амплификация дала два продукта, соответствующих нормальному и альтернативному транскриптам (Рисунок 3.3). Анализ методом денситометрии показал, что нижняя полоса (альтернативный укороченный транскрипт) составляет 52% от общего количества транскриптов, что хорошо согласуется с данными проточной цитофлуориметрии.

Полученные результаты показали возможность отслеживать процессы на уровне мРНК с помощью репортерных минигенов, в которых последовательности, кодирующие флуоресцентные белки TagGFP2 и Katushka, были функционально соединены с фрагментами эукариотических генов, позволяя оценивать процессинг мРНК по флуоресценции репортера на уровне отдельных клеток. Белки давали спектрально различимые сигналы, при этом включение в анализ второго флуоресцентного белка и использование контрольной конструкции для установления базового уровня соотношения интенсивностей флуоресценции в двух каналах позволяло количественно оценить альтернативный сплайсинг на уровне отдельных клеток. Данный подход позволил также выявить гетерогенность клеточных популяций по сплайсингу мРНК.

Мы решили применить схожий принцип для конструирования репортерных конструкций для измерения активности процесса нонсенс-зависимой деградации мРНК (NMD) на уровне отдельных клеток.



**Рисунок 3.3** Анализ клеток HEK293T, транзientно трансфицированных плазмидами *pSplPIG* и *pCtrlPIG*. Приведены графики в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом и красном каналах. Каждая точка соответствует отдельной трансфицированной клетке. Анализ методом проточной цитофлуориметрии проводили для обоих образцов при одинаковых настройках цитофлуориметра, как описано ранее. Область, в которой группируются не трансфицированные клетки, не приведена на рисунке. Область, соответствующая клеткам, трансфицированным конструкцией *pCtrlPIG*, выделена пунктирной линией на рисунке Б. Графики справа показывают количественный анализ для соответствующих графиков слева. Для каждой клетки оценивали процент альтернативного транскрипта, затем эти данные использовали для построения гистограммы распределения клеток в образце. Клетки с «отрицательным» процентом альтернативного транскрипта лежат в области, которая находится ниже средней линии диагональной области, в которой группируются контрольные клетки. Справа также приведены результаты анализа соответствующих образцов кДНК из трансфицированных клеток методом ОТ-ПЦР. Верхняя полоса (примерно 1100 bp) соответствует нормальному транскрипту *PIG3*, нижняя полоса (примерно 900 bp) соответствует альтернативно сплайсированному транскрипту без экзона 4. Процентные соотношения продуктов сплайсинга рассчитывали методом денситометрии с коррекцией на длину фрагментов ДНК. **А.** *pCtrlPIG*; **Б.** *pSplPIG*.

## 3.2 Разработка генетически кодируемых репортеров активности NMD

### 3.2.1 Разработка генетически кодируемого репортера активности опосредуемого сплайсингом NMD

Разработан метод количественной оценки активности NMD на уровне отдельных клеток с использованием двух флуоресцентных белков, обладающих флуоресценцией в зеленом и красном каналах. Один из флуоресцентных белков кодируется мРНК, который является субстратом NMD, а второй флуоресцентный белок используется для контроля уровня экспрессии и эффективности трансфекции.

Для разработанных репортерных конструкций мы использовали зеленый флуоресцентный белок TagGFP2 и дальне-красный флуоресцентный белок Katushka [143], которые при совместной трансфекции в клетках млекопитающих дают яркие и хорошо отличимые флуоресцентные сигналы, как продемонстрировано выше.

Вектора для генетически кодируемого репортера активности опосредуемого сплайсингом NMD, pNMD+ и pNMD-, конструировали, как описано выше, с использованием последовательностей, кодирующих красный флуоресцентный белок TurboFP635 и зеленый флуоресцентный белок TagGFP2. pNMD+ и pNMD- каждый несли два гена, кодирующие флуоресцентные белки, под контролем CMV промоторов ( $P_{CMVIE}$ ), активных в эукариотических клетках, и терминаторов транскрипции (два ранних сигнала полиаденилирования мРНК вируса SV40) (Рисунок 3.4). Первый ген в обоих векторах кодировал дальне-красный флуоресцентный белок Katushka (TurboFP635). Вторым геном кодировал зеленый флуоресцентный белок TagGFP2 и фрагмент гена  $\beta$ -глобина человека после стоп-кодона TagGFP2. В векторе pNMD+ фрагмент гена  $\beta$ -глобина человека включал фрагмент экзона 2, 233 нуклеотида экзона 3 и полноразмерный интрон между ними.

Вектор "pNMD+" кодировал флуоресцентные белки TagGFP2 и Katushka под контролем двух идентичных промоторов (Рисунок 3.4). Чтобы сделать транскрипт, кодирующий зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, мишенью для зависимого от сплайсинга NMD, после стоп-кодона TagGFP2 вставляли фрагмент гена  $\beta$ -глобина человека, несущий функциональный сплайсируемый интрон. После сплайсинга в транслируемой с промотора CMV мРНК стоп-кодон после кДНК TagGFP2 находился на расстоянии 230 нуклеотидов до места соединения экзонов во фрагменте гена  $\beta$ -глобина человека, в результате чего данный стоп-кодон распознавался в клетках млекопитающих как преждевременный, что делало данный транскрипт мишенью для зависимого от сплайсинга NMD. Транскрипт, кодирующий дальне-красный флуоресцентный белок Katushka, служил в качестве контроля для общего уровня экспрессии репортера.

Далее был сконструирован контрольный репортерный вектор "pNMD-", в котором транскрипт, кодирующий зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, не был субстратом

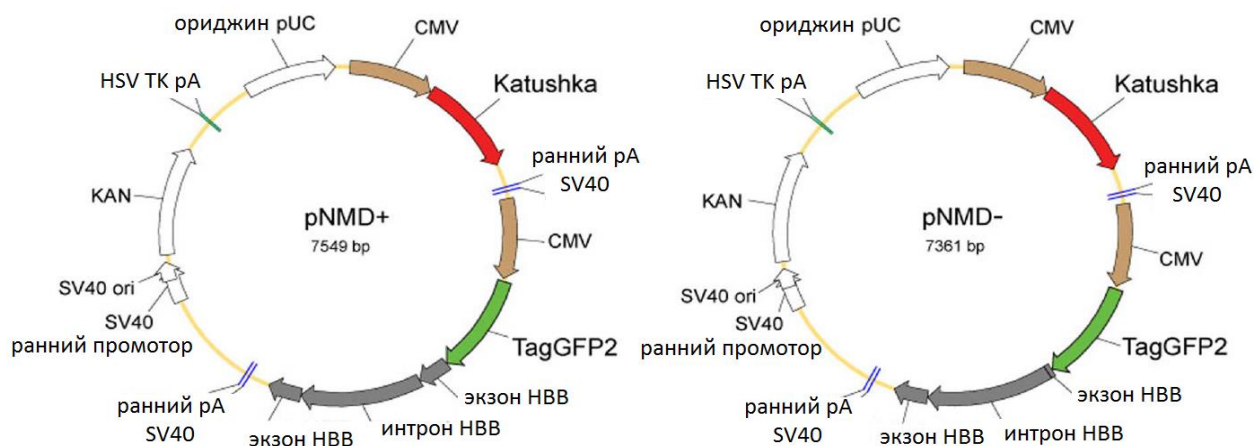
для NMD. Плазмида pNMD<sup>-</sup> была идентична pNMD<sup>+</sup> с тем исключением, что в ней присутствовал укороченный с 5'-конца фрагмент гена β-глобина человека с делецией части экзона 2 (Рисунок 3.4). В плазмиде pNMD<sup>-</sup> присутствовал фрагмент экзона 2 длиной только 35 нуклеотидов. Однако данный фрагмент был достаточен для нормального прохождения сплайсинга расположенного далее интрона β-глобина. Благодаря этому изменению конструкции вектора pNMD<sup>-</sup>, стоп-кодон в транскрипте, кодирующем зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, находился на расстоянии менее чем 50 нуклеотидов до места соединения экзонов при сплайсинге (EJ), и это делало транскрипт устойчивым к NMD. Точное расстояние составляло 41 нуклеотид с учетом сайта рестрикции HindIII, расположенного между фрагментами ДНК, кодирующими зеленый флуоресцентный белок TagGFP2 и фрагмент гена β-глобина человека.

Также в качестве альтернативы был сконструирован второй вариант контрольного репортерного вектора "pNMD<sup>-(i-)</sup>", в котором транскрипт, кодирующий зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, не был субстратом для NMD. Плазмида pNMD<sup>-(i-)</sup> была идентична pNMD<sup>+</sup> с тем исключением, что вместо фрагмента гена β-глобина, несущего интрон, она включала соответствующую сплайсированную безинтронную последовательность мРНК β-глобина. Благодаря этому изменению конструкции вектора pNMD<sup>-(i-)</sup>, после стоп-кодона в транскрипте, кодирующем зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, не образовывался комплекс EJC, и это делало транскрипт устойчивым к NMD. После сплайсинга пре-мРНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, транскрибируемой с вектора pNMD<sup>+</sup>, ее последовательность была идентична последовательности соответствующего транскрипта, транскрибируемого с вектора pNMD<sup>-(i-)</sup>.

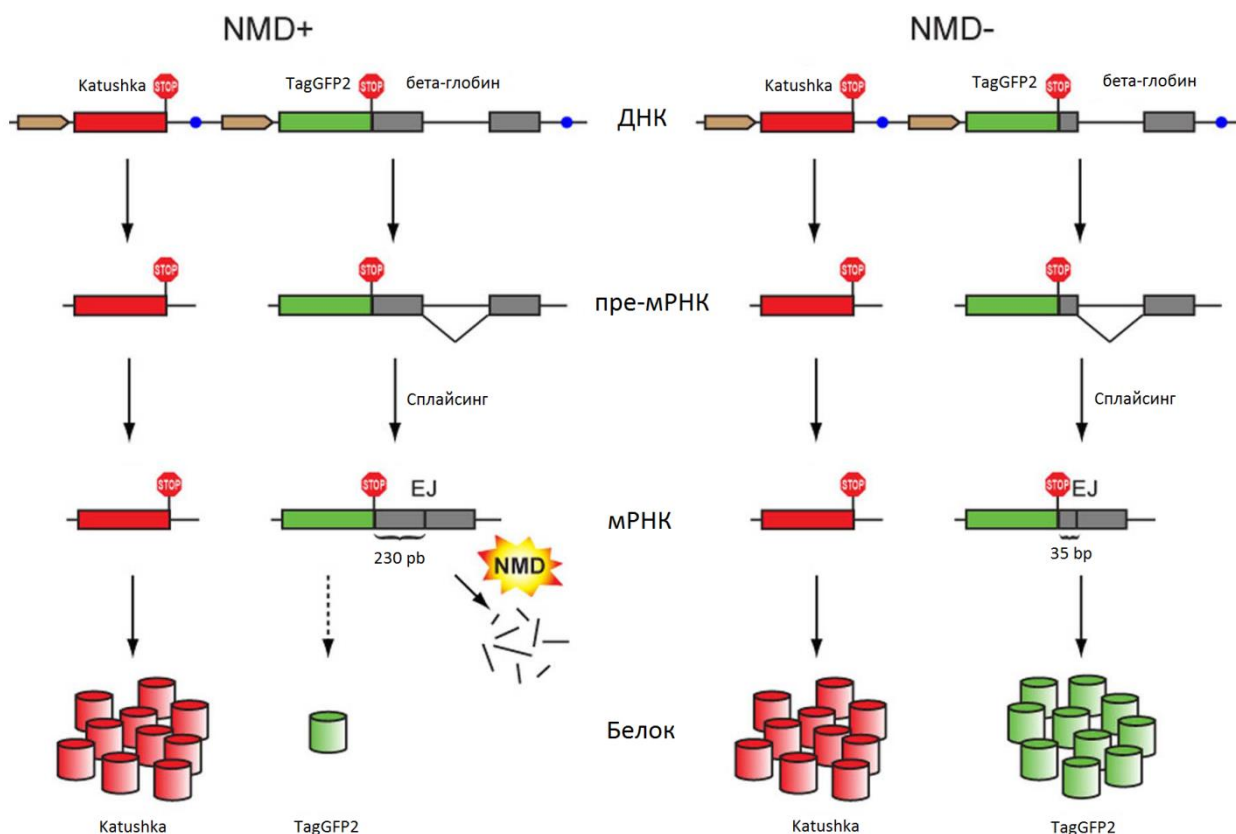
Клетки, трансфицированные pNMD<sup>+</sup>, pNMD<sup>-(i-)</sup> или pNMD<sup>-</sup>, обладают зеленой и красной флуоресценцией. Полученные флуоресцентные сигналы могут быть количественно измерены с помощью стандартных методов, таких как флуоресцентная микроскопия и проточная цитофлуориметрия, как описано выше. Трансфекция клеток с использованием контрольной репортерной конструкции pNMD<sup>-</sup> или pNMD<sup>-(i-)</sup> обеспечивает базовое отношение сигналов флуоресценции в зеленом/красном каналах, которое является характеристикой, присущей каждой конкретной биологической модели или набору параметров детекции. Падение указанного отношения сигналов флуоресценции в зеленом/красном каналах в клетках, трансфицированных репортерной конструкцией pNMD<sup>+</sup>, соответствует снижению уровня транскрипта, кодирующего зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, под действием NMD. Таким образом, разницу

между отношениями сигналов флуоресценции в зеленом/красном каналах в клетках, экспрессирующих репортерные конструкции pNMD<sup>-</sup> (pNMD<sup>-</sup>(i-)) и pNMD<sup>+</sup>, можно использовать для прямого измерения активности NMD в исследуемой биологической модели.

В первой плазмиде, pNMD<sup>+</sup>, кДНК зеленого флуоресцентного белка фланкирован с 3'-конца последовательностью ДНК, содержащей фрагмент 2 экзона, сплайсируемый интрон и фрагмент 3 экзона гена β-глобина. В процессе транскрипции с CMV промотора синтезируется пре-мРНК, содержащая указанные последовательности. В ходе сплайсинга интрон гена β-глобина вырезается, происходит лигирование 2 и 3 экзонов и формирование комплекса EJC вблизи места соединения экзонов. Так как комплекс EJC формируется к 3'-концу от стоп-кодона кодирующего фрагмента кДНК GFP, то стоп-кодон распознается в клетках млекопитающих как ПСК. Содержащая ПСК мРНК подвергается деградации по механизму NMD. Экспрессия векторной конструкции при транзientной трансфекции протекает с различной эффективностью, что приводит к появлению клеток с различной яркостью флуоресценции. В качестве контроля для нормирования на уровень экспрессии в плаزمиде используют вторую открытую рамку считывания (ОРС) красного флуоресцентного белка Katushka. Транскрипция мРНК Katushka инициируется независимо с другого CMV промотора и, в конечном счете, приводит к синтезу флуоресцентного белка (Рисунок 3.5).



**Рисунок 3.4 Схематичное изображение репортерных конструкций pNMD<sup>+</sup> и pNMD<sup>-</sup>.** Приведены основные генетические элементы репортерных конструкций pNMD<sup>+</sup> (слева) и pNMD<sup>-</sup> (справа). Коричневые стрелки – промоторы CMV. Красные стрелки – фрагменты ДНК, кодирующие дальне-красный флуоресцентный белок Katushka. Зеленые стрелки – фрагменты ДНК, кодирующие зеленый флуоресцентный белок TagGFP2. Серые стрелки – фрагменты гена β-глобина (HBV) человека. Конструкции векторов идентичны за исключением делеции в экзоне 2 фрагмента гена β-глобина.

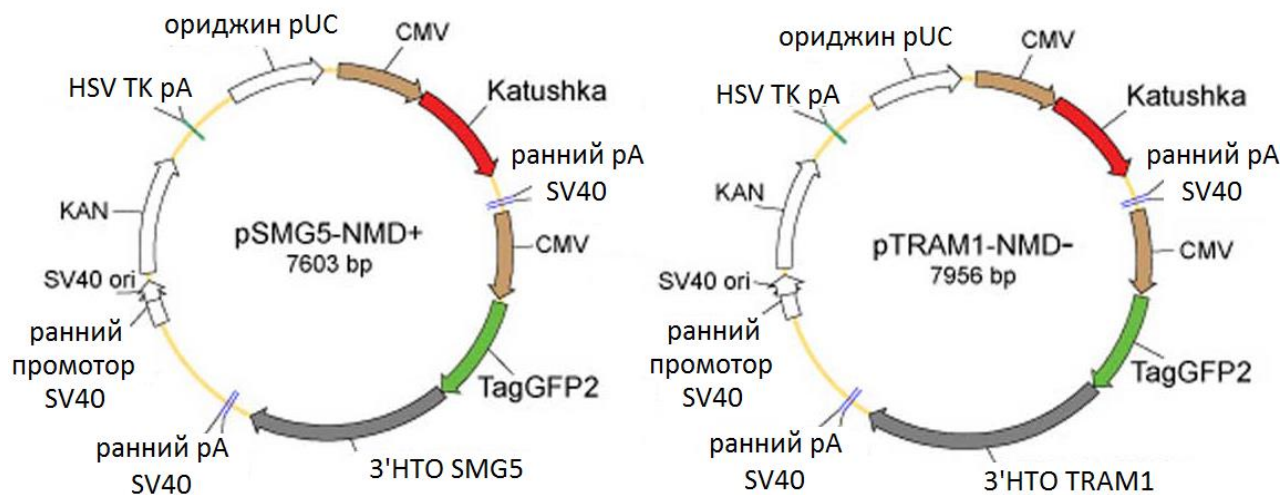


**Рисунок 3.5** Схематичное изображение разработанного метода анализа активности NMD. Плазмида *rNMD+* (слева) кодирует два флуоресцентных белка; первый флуоресцентный белок (*TagGFP2*) кодируется транскриптом, который является мишенью для NMD, а второй флуоресцентный белок (*Katushka*) служит в качестве контроля для уровня экспрессии и трансфекции репортера. Контрольный репортерный вектор *rNMD-* (справа) кодирует оба флуоресцентных белка *Katushka* и *TagGFP2* в виде устойчивых к NMD транскриптов. Сравнение отношений флуоресценции в зеленом и красном каналах между образцами, трансфицированными *rNMD+* и *rNMD-* позволяет количественно оценить активность NMD в живых клетках. Коричневые стрелки – промоторы CMV. Красные, зеленые и серые прямоугольники – фрагменты, кодирующие *Katushka*, *TagGFP2* и фрагмент гена  $\beta$ -глобина человека, соответственно. Синие кружки – терминаторы транскрипции. Красные и зеленые цилиндры – транслированные белки *Katushka* и *TagGFP2*, соответственно.

### 3.2.2 Разработка генетически кодируемого репортера активности независимого от сплайсинга NMD

Предложенную стратегию оценки активности NMD с помощью двух флуоресцентных белков также можно применить для исследования активности независимых от сплайсинга механизмов распознавания ПСК, которые активны во всех эукариотических клетках. Чтобы продемонстрировать возможность такого анализа, мы сконструировали генетические конструкции флуоресцентных репортеров активности NMD, опосредуемого длинными 3'НТО. Мы использовали длинные 3'НТО из мРНК

человеческих генов SMG5 и TRAM1. Из данных литературы известно, что 3'НТО из мРНК SMG5 делает этот транскрипт мишенью для NMD [144], в то время как длинная 3'НТО из мРНК гена TRAM1 не вызывает NMD-распад мРНК [59]. Для создания векторов pSMG5-NMD+ и pTRAM1-NMD- фрагмент гена β-глобина человека в плазмиде pNMD+ заменяли на 3'НТО из мРНК человеческих генов SMG5 и TRAM1, соответственно (Рисунок 3.6). Данные вектора являются флуоресцентными репортерами для пути NMD, в котором распознавание стоп-кодона как ПСК зависит от распознавания длинного 3'НТО.



**Рисунок 3.6** Схематичное изображение репортерных конструкций pSMG5-NMD+ и pTRAM1-NMD-. Приведены основные генетические элементы репортерных конструкций pSMG5-NMD+ (слева) и pTRAM1-NMD- (справа). Коричневые стрелки – промоторы CMV. Красные стрелки – фрагменты ДНК, кодирующие дальне-красный флуоресцентный белок Katushka. Зеленые стрелки – фрагменты ДНК, кодирующие зеленый флуоресцентный белок TagGFP2. Серые стрелки – полноразмерные 3'-НТО мРНК генов SMG5 и TRAM1.

Аналогично описанной выше схеме функционирования репортеров pNMD+ и pNMD-, клетки, трансфицированные pSMG5-NMD+ и pTRAM1-NMD-, обладают зеленой и красной флуоресценцией. Полученные флуоресцентные сигналы могут быть количественно измерены. Трансфекция клеток с использованием контрольной репортерной конструкции pTRAM1-NMD- обеспечивает базовое отношение сигналов флуоресценции в зеленом и красном каналах. Падение указанного отношения сигналов флуоресценции в зеленом/красном каналах в клетках, трансфицированных репортерной конструкцией pSMG5-NMD+, соответствует снижению уровня транскрипта, кодирующего зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, под действием NMD, опосредуемого длинной 3'НТО. Разницу между отношениями сигналов флуоресценции в зеленом и красном каналах можно использовать для прямого измерения активности NMD, опосредуемого длинной 3'НТО, в исследуемой биологической модели.



В плазмиде pSMG5-NMD+ кДНК зеленого флуоресцентного белка фланкирован с 3'-конца последовательностью ДНК, содержащей полноразмерную 3'-НТО SMG5. В процессе транскрипции с CMV промотора синтезируется мРНК, содержащая указанные последовательности. Так как после стоп-кодона в транскрипте, кодирующем TagGFP2, расположена 3'-НТО, чья структура опосредует NMD, то стоп-кодон распознается в клетках млекопитающих как ПСК. Содержащая ПСК мРНК подвергается деградации по механизму независимого от сплайсинга NMD. В качестве контроля для нормирования на уровень экспрессии в обеих плаزمидях, как и в конструкциях pNMD+ и pNMD-, используют вторую открытую рамку считывания (ОРС) дальне-красного флуоресцентного белка Katushka.

### **3.3 NMD в культуре клеток**

#### **3.3.1 Выбор контрольной репортерной конструкции для зависимого от сплайсинга NMD**

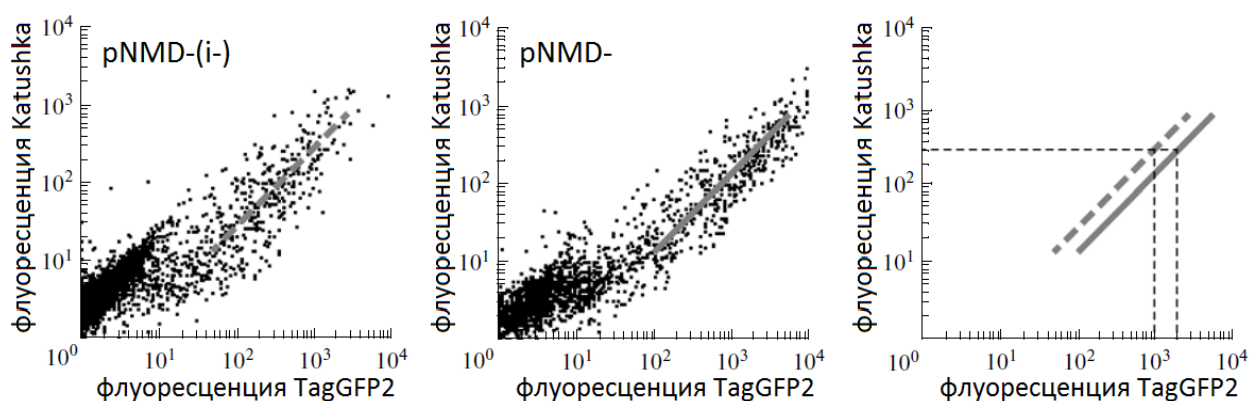
Для разрабатываемого репортера зависимого от сплайсинга NMD было сконструировано 2 варианта контрольных конструкций: pNMD- и pNMD-(i-). Конструкция pNMD-(i-) отличалась отсутствием сплайсируемого интрона во фрагменте гена  $\beta$ -глобина человека. Отсутствие сплайсинга, а также, возможно, регуляторных последовательностей, которые потенциально могут находиться в указанном интроне, может оказать влияние на уровень экспрессии транскрипта, кодирующего зеленый флуоресцентный белок TagGFP2.

Мы решили протестировать полученные конструкции, сравнив отношения сигналов флуоресценции в зеленом и красном канале при транзientной трансфекции в клетках HEK293T. Трансфицированные контрольными плаزمидями клетки обладают яркой флуоресценцией как в красном, так и в зеленом каналах (Рисунок 3.7). Клетки группируются в области, формирующей диагональ в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом и красном каналах. Неожиданно, присутствие сплайсируемого интрона увеличивало отношение сигналов флуоресценции примерно в 2 раза, что соответствовало увеличению уровня экспрессии TagGFP2 в клетках, трансфицированных содержащей интрон конструкцией pNMD- в 2 раза.

Далее для адекватной оценки активности NMD мы решили использовать в работе контрольную репортерную конструкцию pNMD-, так как в соответствующей конструкции pNMD+ присутствует последовательность интрона, и транскрипт,



кодирующий зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, в обоих случаях претерпевает сплайсинг.

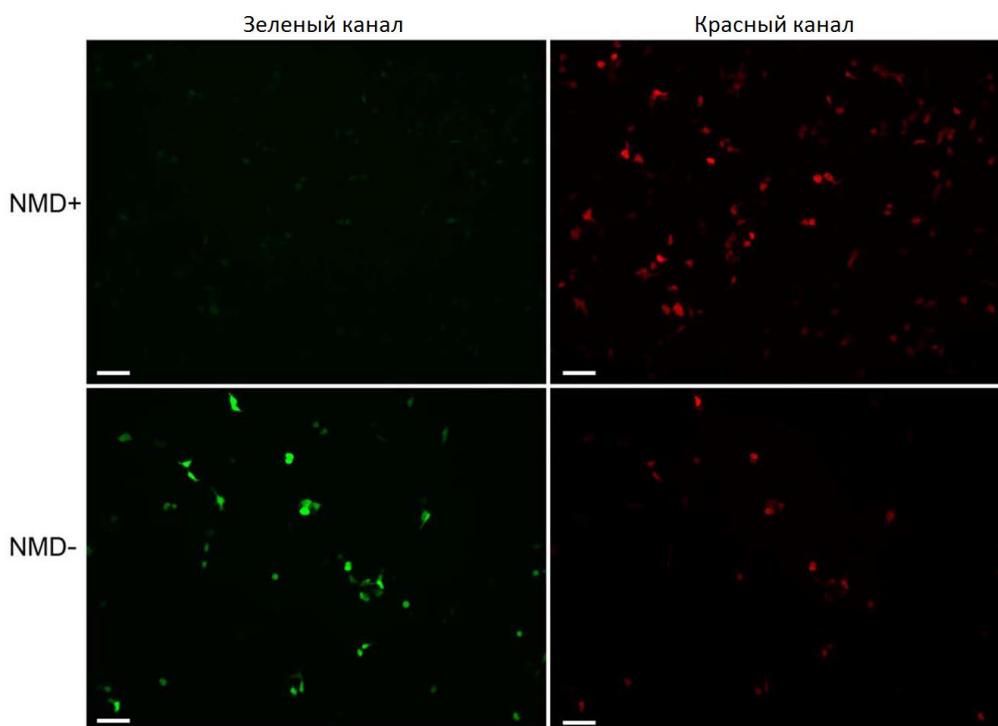


**Рисунок 3.7.** Результаты проточной цитофлуориметрии клеток, временно трансфицированных векторами *pNMD-(i-)* (слева) или *pNMD-* (в центре). Результаты приведены в виде графиков в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом (флуоресценция TagGFP2) и красном (флуоресценция Katushka) каналах. Каждая точка соответствует отдельной трансфицированной клетке. Анализ методом проточной цитофлуориметрии проводили для обоих образцов при одинаковых настройках цитофлуориметра, как описано ранее. Для удобства сравнения клеточных популяций между собой середина диагональной области, в которой группируются клетки *pNMD-(i-)*, показана пунктирной линией, а середина диагональной области, в которой группируются клетки *pNMD-*, показана сплошной линией. На графике справа представлено сравнение середин “диагоналей” распределения клеточных популяций *pNMD-(i-)* и *pNMD-*.

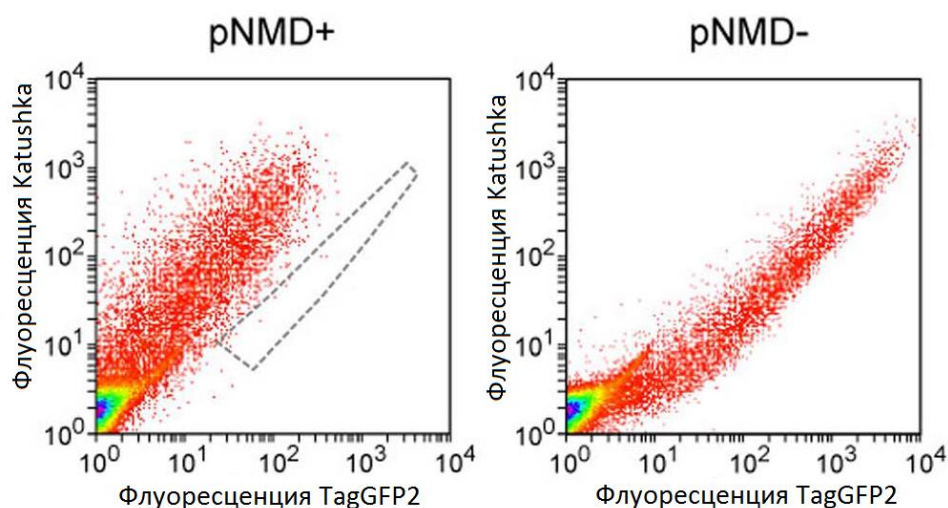
### 3.3.2 Тестирование репортера для зависимого от сплайсинга NMD в линии клеток млекопитающих

Сначала мы протестировали разработанные флуоресцентные репортеры активности зависимого от сплайсинга NMD в линиях клеток млекопитающих. Клетки линии НЕК293Т транзientно трансфицировали плазмидами *pNMD-* или *pNMD+* и анализировали методом флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. При анализе методом флуоресцентной микроскопии клетки, трансфицировали плазмидой *pNMD-*, характеризовались яркой флуоресценцией как в красном, так и в зеленом канале, в то время как клетки, трансфицировали плазмидой *pNMD+*, обладали сравнимой по интенсивности флуоресценцией в красном канале, но интенсивность флуоресценции этих клеток в зеленом канале была значительно снижена (Рисунок 3.8). Затем трансфицированные клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Анализ показал, что трансфицированные плазмидами *pNMD-* или *pNMD+* клетки группируются в области, формирующей диагональ в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом и красном каналах (Рисунок 3.9). Диагональная

область, в которой группируются клетки, трансфицированные плазмидой pNMD+, существенно смещена влево относительно области, в которой группируются клетки, трансфицированные плазмидой pNMD-, что соответствует падению уровню флуоресценции в зеленом канале по сравнению с трансфекцией контрольной конструкцией pNMD-. При этом, важно отметить, что уровень флуоресценции дальне-красного флуоресцентного белка Katushka был примерно одинаковым для обоих образцов. Среднее отношение флуоресцентных сигналов в зеленом и красном каналах для образца клеток, трансфицированных pNMD-, было в  $15,3 \pm 1,2$  раза выше по сравнению с аналогичным отношением для образца клеток, трансфицированных pNMD+ (Рисунок 3.12). Также необходимо отметить, что в эксперименте измеряемая активность NMD не зависела от уровня экспрессии транскриптов репортера (Рисунок 3.9). Вычисляемые значения активности NMD были одинаковыми как при оценке всей популяции трансфицированных клеток, так и отдельных субпопуляций клеток с высоким, средним и низким уровнем флуоресценции. Этот факт демонстрирует, что даже высокий уровень экспрессии транскрипта-мишени NMD флуоресцентного репортера, опосредуемый сильным промотором CMV, не приводит к насыщению пути NMD субстратом, и даже в клетках с максимальным уровнем экспрессии субстрат-мишень не накапливается.

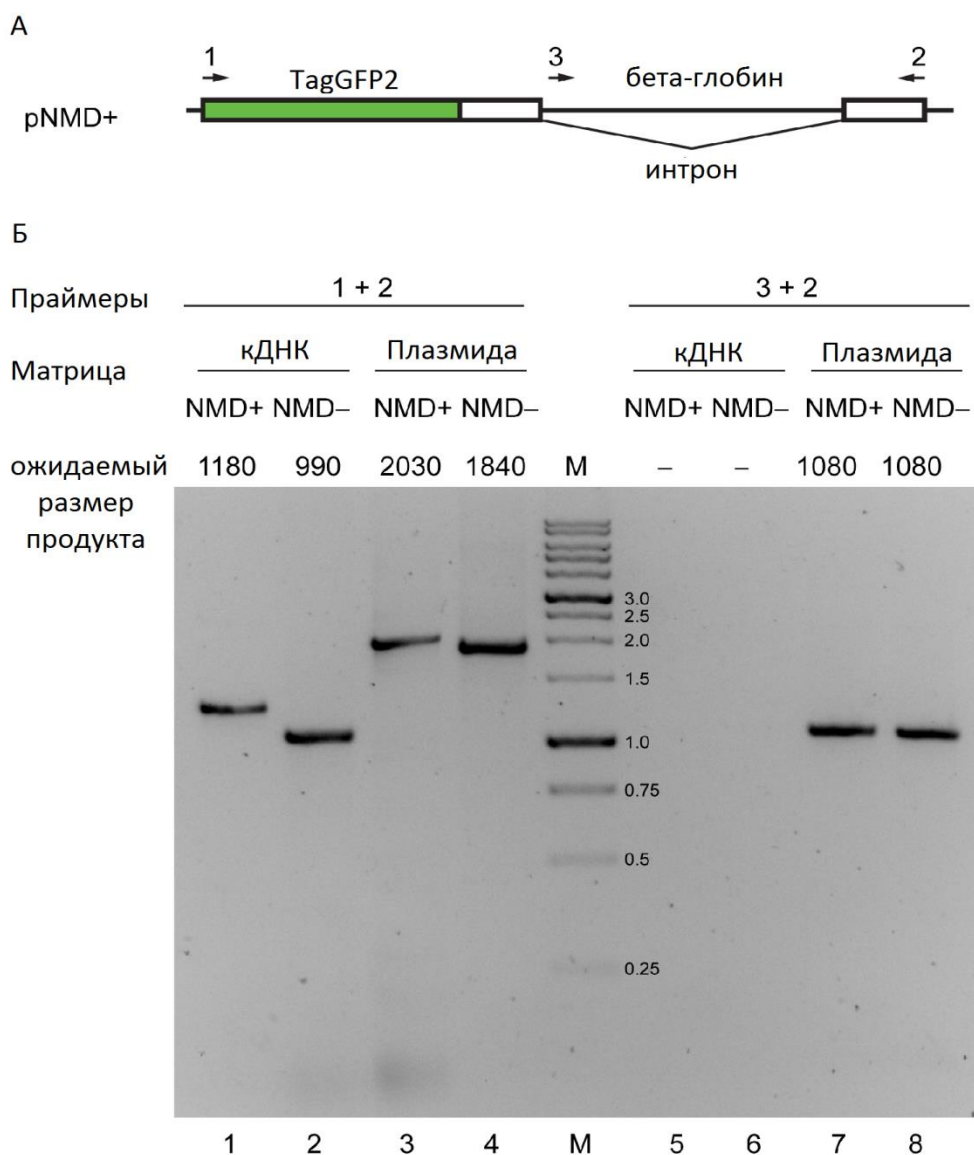


**Рисунок 3.8** Флуоресцентная микроскопия клеток HEK293T, транзистентно трансфицированных репортерными конструкциями pNMD+ и pNMD-. Флуоресцентную микроскопию трансфицированных обеими плазмидами клеток проводили при одинаковых настройках. Масштабная линейка: 100 мкм.



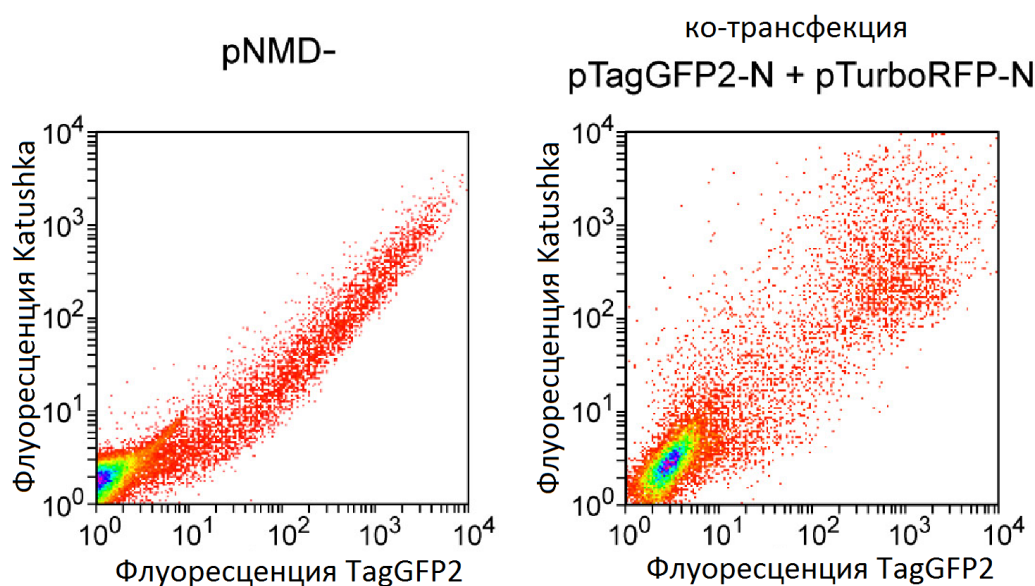
**Рисунок 3.9** Анализ клеток *HEK293T*, транзистентно трансфицированных репортерными конструкциями *pNMD+* (слева) и *pNMD-* (справа), методом проточной цитофлуориметрии. Результаты приведены в виде графиков в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом (флуоресценция *TagGFP2*) и красном (флуоресценция *Katushka*) каналах. Каждая точка соответствует отдельной трансфицированной клетке. Цвет точек на рисунке отражает плотность событий в данной области координат. Анализ методом проточной цитофлуориметрии проводили для обоих образцов при одинаковых настройках цитофлуориметра с использованием протокола с заранее подобранными значениями усиления и компенсации, исключающими возможность регистрации флуоресценции *TagGFP2* в красном канале и флуоресценции *Katushka* в зеленом канале, как описано ранее. Для наглядности сравнения область, в которой группируются клетки, трансфицированные контрольной конструкцией *pNMD-*, выделена пунктиром.

Чтобы оценить правильность сплайсинга сконструированного репортера активности NMD, мы провели ПЦР-анализ с различными парами праймеров с использованием амплифицированной библиотеки кДНК из трансфицированных плазмидами *pNMD+* и *pNMD-* клеток *HEK293T* в качестве матрицы. Анализ продемонстрировал присутствие только правильно сплайсированных продуктов в клетках *HEK293T* после трансфекции (Рисунок 3.10). Так как потенциальный несплайсированный фрагмент был длиннее правильно сплайсированного фрагмента примерно на 500 bp (длина интрона) и поэтому должен был менее эффективно амплифицироваться в ходе ПЦР, мы дополнительно включили в анализ реакцию с праймерами 3 и 2, которая должна была привести к эффективной амплификации короткого фрагмента в случае присутствия несплайсированного фрагмента в матрице. Не было обнаружено присутствие несплайсированных и альтернативно сплайсированных транскриптов, кодирующих *TagGFP2*, в клетках *HEK293T*. Это указывает, функционирование репортерных конструкций на уровне мРНК соответствует разработанной схеме для анализа (Рисунок 3.5).



**Рисунок 3.10** Анализ сплайсинга транскриптов репортерных конструкций *rNMD+* и *rNMD-* в клетках HEK293T. **А.** Схема гена, кодирующего транскрипт-мишень для NMD, из плазмиды *rNMD+*, кодирующего TagGFP2 (зеленый прямоугольник) и фрагмент гена  $\beta$ -глобина человека, состоящий из фрагментов экзонов 2 и 3 (белые прямоугольники) и интрона между ними. Соответствующий контрольный ген из плазмиды *rNMD-*, кодирующий TagGFP2, отличается укороченным на 190 bp 2 экзоном. Стрелки 1-3 показывают позиции отжига используемых праймеров для ПЦР. **Б.** Агарозный гель-электрофорез продуктов ПЦР. Для амплификации практически полноразмерного транскрипта (от стартового кодона TagGFP2 до сигнала полиаденилирования SV40) использовали праймеры 1 и 2 (дорожки 1-4). Чтобы исследовать наличие несплайсированного интрона, для ПЦР использовали праймеры 3 и 2 (дорожки 5-8). ПЦР-амплификацию (25 циклов) проводили на матрице амплифицированной библиотеки кДНК из клеток HEK293T, трансфицированных репортерными плазмидами *rNMD+* (дорожки 1 и 5) или *rNMD-* (дорожки 2 и 6). В качестве контроля соответствующие реакции ПЦР проводили с использованием плазмид *rNMD+* (дорожки 3 и 7) или *rNMD-* (дорожки 4 и 8) в качестве матриц. М – маркер длин фрагментов ДНК 1 kb. На рисунке указаны соответствующие длины фрагментов ДНК маркера длин ДНК. Видно соответствие продуктов амплификации ожидаемым размерам и отсутствие побочных продуктов альтернативного сплайсинга или несплайсированных фрагментов.

Для отслеживания активности NMD вместо разработанных двухпромоторных репортерных конструкций pNMD+ и pNMD- потенциально можно использовать обычную ко-трансфекцию двумя плазмидами, одна из которых несет ген флуоресцентного белка для нормирования уровня экспрессии и трансфекции, а другая – ген, кодирующий транскрипт для второго флуоресцентного белка, который является мишенью для NMD. Чтобы продемонстрировать преимущества разработанного метода в контрольном эксперименте мы сравнили ко-трансфекцию клеток HEK293T двумя плазмидами, кодирующими флуоресцентные белки TagGFP2 или Katushka, с трансфекцией разработанной контрольной репортерной конструкцией pNMD- (Рисунок 3.11).



**Рисунок 3.11** Анализ методом проточной цитофлуориметрии клеток HEK293T, трансфицированных контрольной репортерной плазмидой pNMD-, или ко-трансфицированных плазмидами pTagGFP2-N и pTurboRFP-N. Результаты приведены в виде графиков в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом (флуоресценция TagGFP2) и красном (флуоресценция Katushka) каналах. Каждая точка соответствует отдельной трансфицированной клетке. Цвет точек на рисунке отражает плотность событий в данной области координат. Анализ методом проточной цитофлуориметрии проводили для обоих образцов при одинаковых настройках цитофлуориметра, как описано ранее. Рисунок показывает, что совмещение двух флуоресцентных кассет в одной генетической конструкции приводит к меньшему разбросу значений флуоресценции в красном и зеленом канале по сравнению с ко-трансфекцией двумя отдельными плазмидами.

Анализ трансфицированных клеток методом проточной цитофлуориметрии показал, что клетки, ко-трансфицированные отдельными плазмидами, имели существенно более высокий разброс флуоресцентных сигналов в зеленом и красном каналах и больший разброс отношений сигнал в зеленом канале/сигнал в красном канале (более широкая диагональная область в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в



зеленом и красном каналах) по сравнению с клетками, контрольной репортерной конструкцией рNMD<sup>-</sup>. Таким образом, объединение двух кассет экспрессии в одной репортерной плазмиде имеет преимущество по сравнению с ко-трансфекцией.

### **3.3.3 Оценка способности разработанного репортера зависимо от сплайсинга NMD отслеживать изменения активности NMD в клетках HEK293T**

Чтобы проверить способность разработанной нами репортерной системы детектировать изменения активности процесса NMD, мы протестировали репортерную систему с использованием различных известных низкомолекулярных ингибиторов NMD и нокаута ключевого фактора NMD UPF1 под действием специфической короткой шпилечной РНК (кшРНК).

Сначала мы использовали вортманнин и кофеин, которые блокируют фосфорилирование UPF1 РИКК-протеинкиназой SMG1, что нарушает функционирование NMD [31,61,131,136,137,139]. В результате мы наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции в зеленом канале для клеток, трансфицированных рNMD<sup>+</sup>, что соответствовало ожидаемому ингибированию активности NMD, в то время как отношения интенсивностей флуоресцентных сигналов для клеток, трансфицированных рNMD<sup>-</sup>, изменилось незначительно (<30%) (Рисунок 3.12 и 3.13). Данные ингибиторы действуют на все РИКК-протеинкиназы, поэтому не являются специфичными для процесса NMD. Поэтому далее мы использовали специфичное ингибирование NMD за счет нокаута UPF1.

Мы использовали известный эффект специфического подавления активности NMD под действием РНК-интерференции [20]. Был сконструирован вектор pshUPF1, кодирующий кшРНК против hUPF1 [136,137].

Чтобы проверить способность полученной конструкции подавлять экспрессию транскрипта-мишени, мы сначала использовали анализ с флуоресцентным репортером mKate2-upf1. Во флуоресцентном репортере mKate2-upf1 фрагмент ДНК, кодирующий дальне-красный флуоресцентный белок mKate2 [143], соединен с фрагментом 3'НТО транскрипта hUPF1, который содержит последовательность-мишень для используемой кшРНК (Рисунок 3.14). При этом фрагмент 3'НТО hUPF1 не влияет на флуоресценцию mKate2, так как отделен от него стоп-кодоном. Таким образом, транскрипт, кодирующий дальне-красный флуоресцентный белок mKate2, является мишенью для кшРНК и позволяет оценить эффективность pshUPF1 по флуоресцентному сигналу mKate2. Клетки, ко-трансфицированные конструкцией mKate2-upf1 и контрольной плазмидой shControl, не

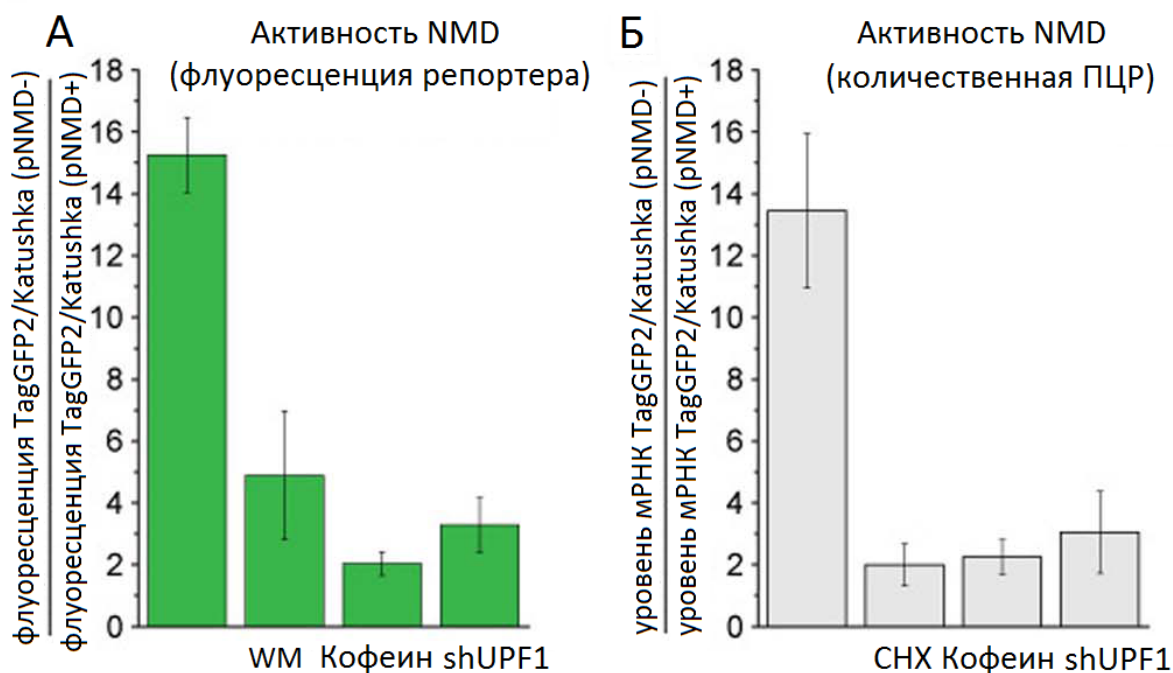
несущей специфической кшРНК, характеризовались яркой флуоресценцией в красном канале при анализе методом проточной цитофлуориметрии. Напротив, ко-трансфекция клеток HEK293 плазмидами mKate2-upf1 и pshUPF1 привела к практически полному исчезновению флуоресцентного сигнала (Рисунок 3.14). Таким образом, pshUPF1 эффективно подавлял экспрессию транскрипта-мишени в данной модели.

Чтобы напрямую оценить эффективность подавления экспрессии hUPF1 в культуре клеток с помощью pshUPF1, мы анализировали деплецию эндогенного hUPF1 на уровне белка с помощью анализа методом Вестерн-блоттинг с использованием анти-UPF1 антител. В этом случае анализ транзientных трансфекций был бы малоинформативным из-за присутствия нетрансфицированных клеток с не измененным уровнем UPF1. В случае ко-трансфекции pshUPF1 с репортерными плазмидами такой проблемы не возникало, так как при относительно высокой эффективности трансфекции с использованием катионных липофильных реагентов и при высоком молярном избытке плазмиды pshUPF1 подавляющее большинство трансфицированных репортером клеток получало плазмиду, кодирующую кшРНК. Чтобы решить проблему присутствия нетрансфицированных pshUPF1 клеток, мы использовали вектор pGreenPuroUPF, идентичный pshUPF1 за исключением наличия кассеты, кодирующей флуоресцентный маркер copGFP и пурамицин-ацетилтрансферазу. После трансфекции и отбора на пурамицине в течение 7 дней, что соответствовало по времени экспериментам с использованием репортеров NMD и pshUPF1, мы получали популяцию практически 100% трансфицированных клеток с яркой зеленой флуоресценцией. Анализ лизатов клеток методом Вестерн-блоттинг показал приблизительно 10-кратное падение уровня UPF1 в клетках, обработанных кшРНК против hUPF1, по сравнению с обработанными контрольной плазмидой pGreenPuro клетками (Рисунок 3.14). Мы пришли к выводу, что используемая нами кшРНК против hUPF1 обеспечивала эффективную деплецию UPF1 в нашей экспериментальной модели.

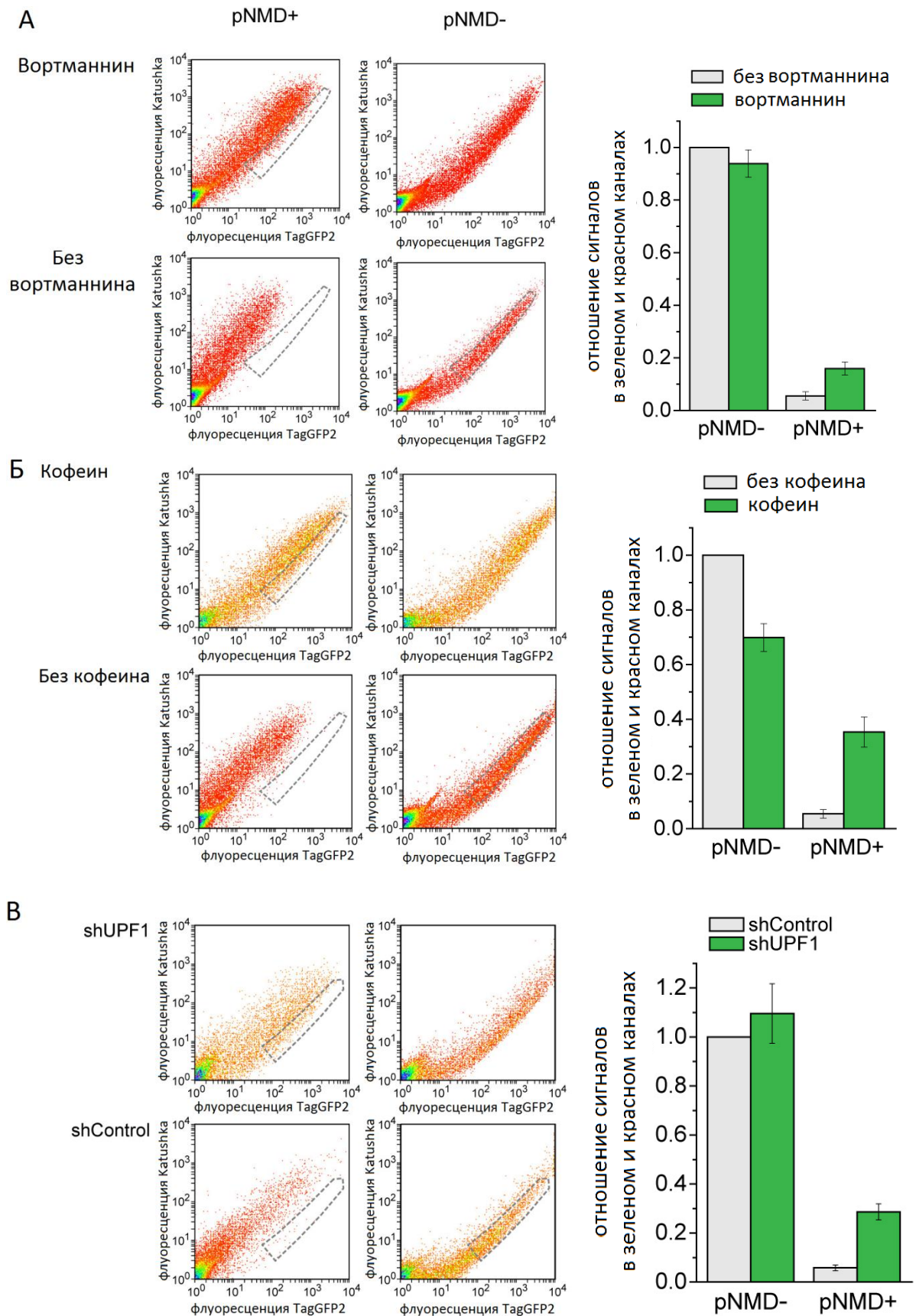
Затем мы провели ко-трансфекцию репортерных плазмид pNMD+ и pNMD- с конструкцией pshUPF1 и контрольной конструкцией shControl. Через 6 дней после ко-трансфекции с pshUPF1 мы наблюдали сильный рост флуоресцентного сигнала в зеленом канале по отношению к красному каналу для клеток, трансфицированных плазмидой pNMD+, в то время для клеток, трансфицированных плазмидой pNMD-, отношение сигналов было практически неизменным (Рисунок 3.12 и 3.13). Отрицательный контроль без специфической кшРНК (конструкция shControl) практически не влияла на флуоресценцию репортера (Рисунок 3.13).

Для верификации полученных значений активности NMD мы измерили активность процесса независимым стандартным методом в тех же экспериментальных условиях. Для этой цели образцы клеток НЕК293Т, трансфицированных репортерными конструкциями pNMD<sup>-</sup> или pNMD<sup>+</sup>, исследовали методом количественной ОТ-ПЦР параллельно анализу флуоресценции, описанному ранее. Уровень мРНК, кодирующей TagGFP2, измеряли в каждом образце относительно уровня мРНК, кодирующей Katushka. С помощью количественной ПЦР оценивали активность NMD в не обработанных ингибиторами клетках, а также клетках, обработанных кофеином и shUPF1 (Рисунок 3.12). Вортманнин и кофеин ингибируют NMD, действуя на одну и ту же мишень, поэтому анализ методом количественной ПЦР проводили только для образцов, обработанных кофеином, который давал более выраженный ингибиторный эффект, обработка shUPF1 также была выбрана для данного анализа, так как обеспечивала специфическое ингибирование NMD в отличие от применяемых низкомолекулярных ингибиторов процесса. Данный анализ показал хорошее соответствие между активностью NMD, измеренной по флуоресценции репортера и с помощью количественной ПЦР, для всех исследованных образцов (Рисунок 3.12). Кроме того, с помощью количественной ПЦР оценивали ингибиторный эффект ингибитора синтеза белка циклогексимида (СНХ). Как известно из данных литературы, СНХ является мощным ингибитором NMD, так как для запуска распада мРНК под действием NMD необходима трансляция мРНК-мишени [139]. В обработанных СНХ клетках, трансфицированных конструкцией pNMD<sup>+</sup>, методом количественной ОТ-ПЦР было обнаружено значительное увеличение уровня транскрипта-мишени NMD (данный эффект не может быть измерен с помощью анализа флуоресценции из-за ингибирования синтеза белка) (Рисунок 3.12).



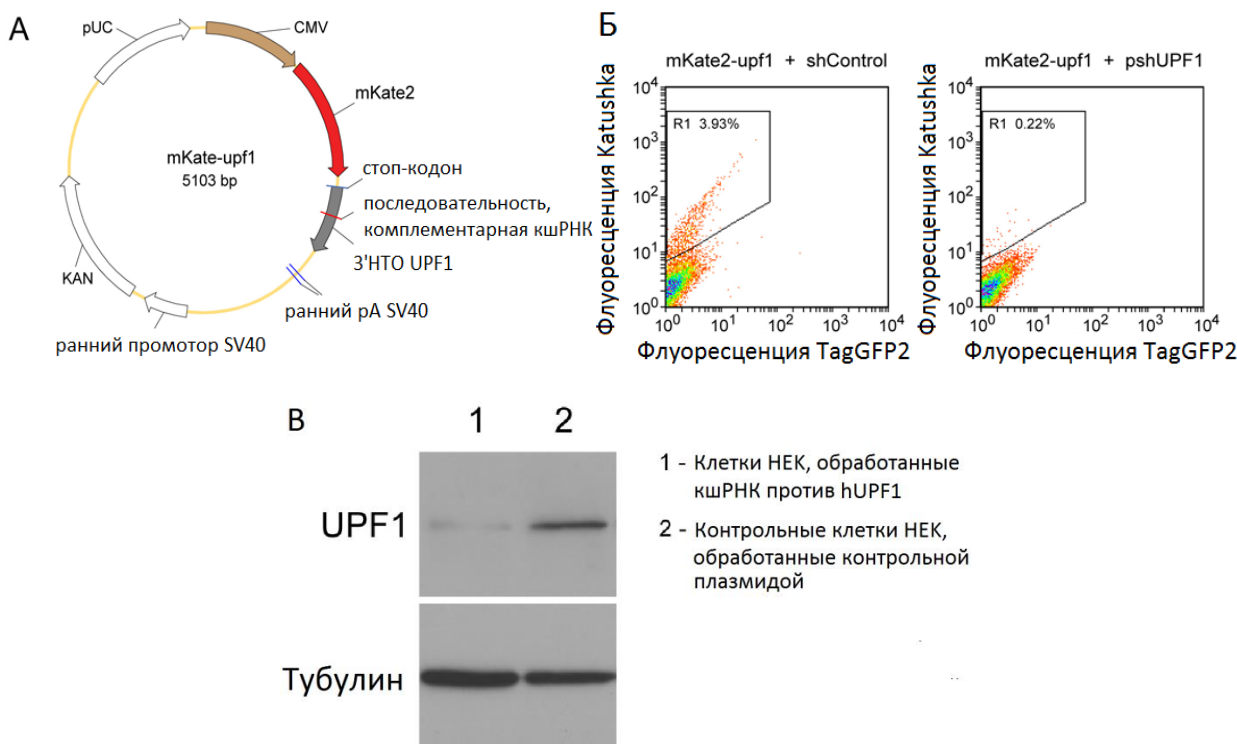


**Рисунок 3.12** Оценка способности разработанного репортера зависящего от сплайсинга NMD отслеживать изменения активности NMD в клетках HEK293T. **А.** Активность NMD определяли по флуоресцентному сигналу репортера в клетках HEK293T, транзientно трансфицированных плазмидами pNMD+ и pNMD-. **Б.** Активность NMD определяли с помощью количественной ПЦР транскриптов репортера в клетках HEK293T, транзientно трансфицированных плазмидами pNMD+ и pNMD-. При обработке клеток известными ингибиторами активности NMD вортманнином (WM), кофеином, кшРНК против UPF1 (shUPF1) и циклогексимидом (CHX) наблюдалось значительное ингибирование активности NMD как по данным анализа флуоресценции, так и по данным количественной ПЦР. Анализ флуоресценции клеток при обработке циклогексимидом не проводили, т.к. циклогексимид является ингибитором трансляции. Значения активности NMD как в интактных клетках, так и при обработке клеток ингибиторами процесса были по существу одинаковыми при измерении флуоресцентных сигналов и при измерении методом количественной ПЦР. Приведены усредненные данные для 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением.



**Рисунок 3.13** Эффект различных ингибиторов NMD на флуоресценцию репортерных конструкций рNMD+ и рNMD-. Анализ клеток HEK293T, транзientно трансфицированных рNMD+ (слева) or рNMD- (справа). Каждая точка соответствует отдельной трансфицированной клетке. Цвет точек на рисунке отражает плотность

событий в данной области координат. Анализ методом проточной цитофлуориметрии проводили для образцов при одинаковых настройках цитофлуориметра, как описано ранее. Для наглядности сравнения область, в которой группируются клетки, трансфицированные контрольной конструкцией *pNMD-*, выделена пунктиром. **А.** Обработанные и не обработанные вортманнином клетки. **Б.** Обработанные и не обработанные кофеином клетки. **В.** Клетки, ко-трансфицированные *pNMD+* или *pNMD-* совместно с *pshUPF1* или *pshControl* (6 дней после трансфекции). На рисунке графики справа показывают относительные значения отношения сигналов флуоресценции в зеленом и красном канале (значение отношения для не обработанных ингибиторами образцов *pNMD-* приняты за 1). Показаны усредненные значения и стандартное отклонение для 3 независимых экспериментов.

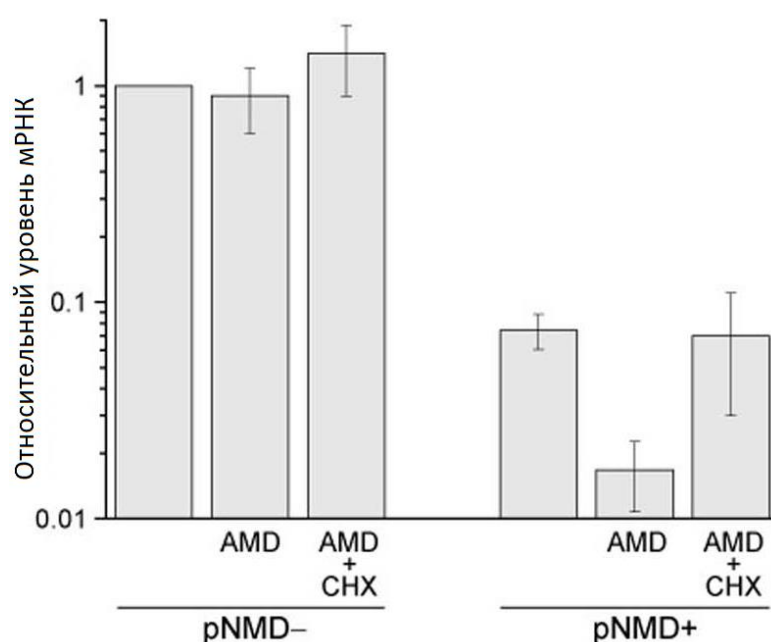


**Рисунок 3.14 Эффективность кшРНК против hUPF1.** **А.** Основные генетические элементы репортерного вектора *mKate-upf1*. Коричневая стрелка – промотор CMV. Красная стрелка – фрагмент ДНК, кодирующий дальне-красный флуоресцентный белок *mKate2*. Серая стрелка – 3'НТО UPF1. **Б.** Анализ клеток HEK293T, транзистентно ко-трансфицированных плазмидой *mKate-upf1* и *shControl* (слева) или *pshUPF1* (справа). Заметно сильное падение флуоресценции при ко-трансфекции с плазмидой, кодирующей кшРНК. **В.** Анализ клеток HEK293, трансфицированных конструкцией, кодирующей кшРНК против UPF1, (дорожка 1) и контрольной конструкцией *pGreenPuro* (дорожка 2) методом Вестерн-блоттинг. Тубулин использовали для нормирования уровня UPF1. Заметна деплеция белка UPF1 под действием кшРНК.

Для оценки ожидаемой дестабилизации кодирующего TagGFP2 транскрипта, являющегося мишенью NMD, мы использовали ингибитор транскрипции актиномицин Д (AMD). Анализ методом количественной ПЦР показал, что после 1 часа обработки клеток актиномицином уровень кодирующего TagGFP2 транскрипта в образце клеток, трансфицированных конструкцией *pNMD+*, снизился примерно в 4 раза, в то время как

уровень кодирующего TagGFP2 транскрипта в образце клеток, трансфицированных конструкцией pNMD-, оставался стабильным (Рисунок 3.15). Важно отметить, что совместная обработка AMD и ингибитором NMD CHX приводила к стабилизации кодирующего TagGFP2 транскрипта в образце pNMD+, что доказывает, что его распад опосредован NMD.

Взятые вместе, проведенные эксперименты позволяют заключить, что разработанная репортерная система обеспечивает надежный метод измерения активности NMD.



**Рисунок 3.15** Оценка стабильности мРНК, кодирующей TagGFP2, для репортерных конструкций pNMD+ и pNMD- в клетках HEK293T. Уровень мРНК TagGFP2 измеряли с помощью количественной ПЦР для образцов клеток HEK293T, трансфицированных pNMD+ или pNMD-, которые не подвергали обработке или обрабатывали ингибитором трансляции актиномицином Д или актиномицином Д совместно с ингибитором NMD циклогексимидом (CHX). Уровень мРНК TagGFP2 сначала нормировали на уровень мРНК *Kat5hka*, а затем нормировали на базовый уровень мРНК TagGFP2 в образце pNMD-, который принимали за единицу (первый столбик слева). Приведены усредненные данные для 3 независимых экспериментов со стандартным отклонением. Уровень транскрипта TagGFP2 в образце pNMD+ изначально заметно ниже, чем в образце pNMD- за счет его распада под действием NMD. Обработка AMD показывает, что транскрипта TagGFP2 в образце pNMD+ значительно дестабилизирован по сравнению с образцом pNMD- и быстро подвергается распаду. Обращение этого эффекта при совместной обработке клеток AMD и ингибитором NMD CHX демонстрирует, что эта дестабилизация обусловлена активностью NMD.

### 3.3.4 Применение разработанного репортера для измерения активности зависящего от сплайсинга NMD в различных линиях клеток

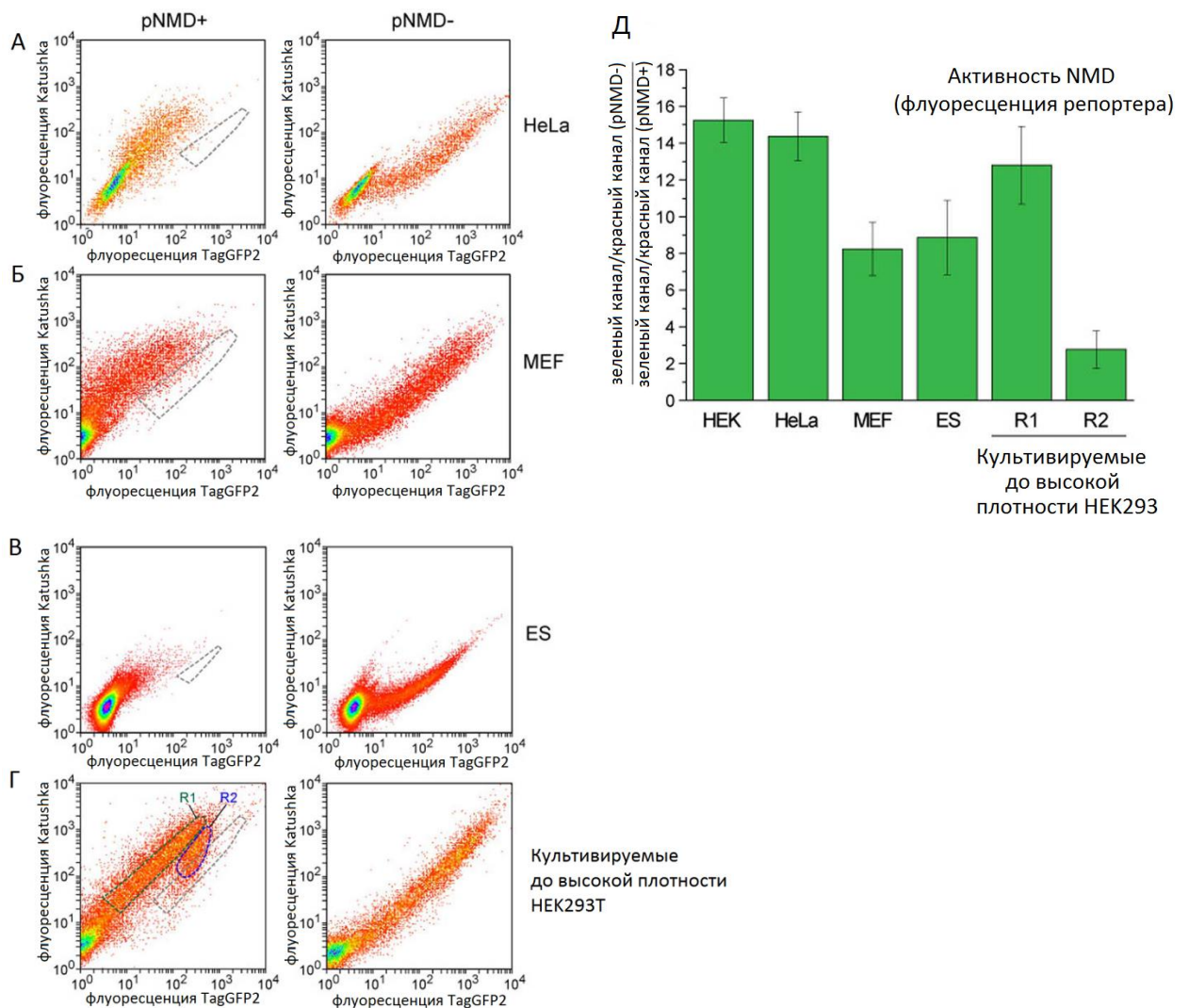
После проверки работоспособности разработанных репортерных конструкций в линии клеток HEK293T мы использовали конструкции pNMD+ и pNMD- для сравнения активности NMD в различных клетках млекопитающих (Рисунок 3.16). В линии клеток HeLa Kyoto снижение уровня транскрипта-мишени NMD составило  $14,4 \pm 1,3$  раз, что сходно с активностью NMD клетках HEK293T. Вместе с тем, исследованные первичные культуры клеток, а именно эмбриональные стволовые клетки мыши (ES) и мышечные эмбриональные фибробласты (MEF) продемонстрировали заметно более низкую активность NMD – снижение уровня транскрипта-мишени в  $8,9 \pm 2,0$  и  $8,3 \pm 1,5$  раз, соответственно. Полученные данные согласуются с показанными ранее различиями активности NMD в различных линиях клеток [145].

Интересно отметить, что в некоторых условиях нам удалось наблюдать отчетливую гетерогенность активности NMD в клетках одной популяции, культивируемых в одной чашке. Культивируемые до высокой плотности клетки HEK293T содержали различимую популяцию клеток, активность NMD в которых была в несколько раз ниже по сравнению с активностью NMD в остальной части клеток (Рисунок 3.16) Необходимо также подчеркнуть, что такая гетерогенность клеточных популяций по активности NMD была выявлена впервые.

Так как этот эффект наблюдался для клеток, культивируемых до высокой плотности, мы предположили, что снижение активности NMD можно объяснить механизмом клеточного стресса в областях с высокой плотностью клеток [60,69,146]. Другим потенциальным объяснением является повышение уровня кальция при контактном ингибировании роста клеток. Было показано, что зависимость от плотности клеток остановка роста клеток опосредована сигналингом через интегрины и повышением уровня кальция в клетках [147–149]. Как было недавно показано, повышение уровня внутриклеточного кальция приводит к ингибированию NMD. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что наблюдаемая гетерогенность активности NMD в клетках, культивируемых до высокой плотности, обусловлена повышением внутриклеточного уровня кальция в областях с высокой плотностью клеток.

Необходимо отметить, что указанную гетерогенность было невозможно обнаружить с использованием классических методов измерения активности NMD с использованием количественного измерения уровней РНК или с помощью известного люминесцентного [137,61] или флуоресцентного репортера на основе GFP [136].



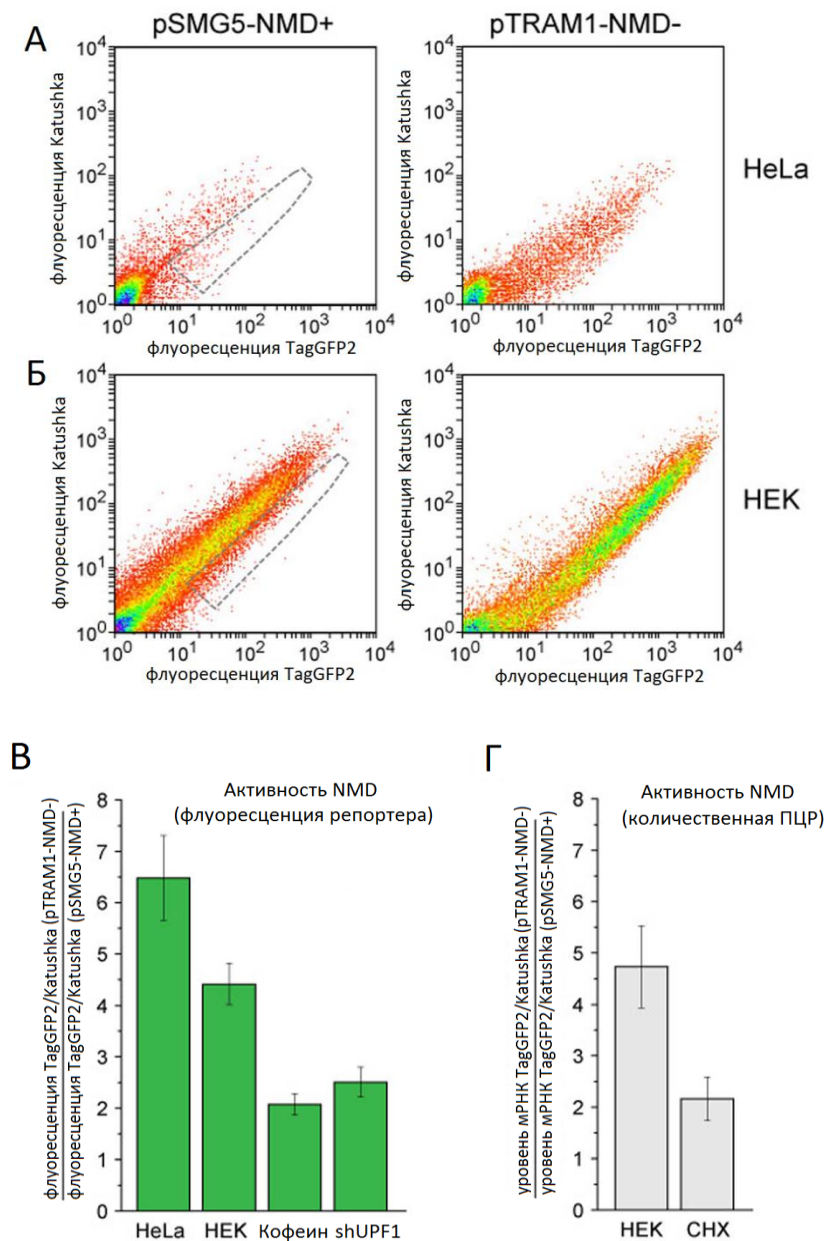


**Рисунок 3.16** Измерения активности NMD с помощью зависимо от сплайсинга репортера в различных клеточных линиях. А-Д. Анализ клеток HEK293T, транзientно трансфицированных pNMD+ (слева) or pNMD- (справа). Каждая точка соответствует отдельной трансфицированной клетке. Цвет точек на рисунке отражает плотность событий в данной области координат. Анализ методом проточной цитофлуориметрии проводили для образцов при одинаковых настройках цитофлуориметра, как описано ранее. Для наглядности сравнения область, в которой группируются клетки, трансфицированные контрольной конструкцией pNMD-, выделена пунктиром. А. Клетки HeLa. Б. Клетки MEF В. Клетки ES. Г. Культивируемые до высокой плотности клетки HEK293T. Заметна четкая гетерогенность активности NMD в этих клетках. Зеленая и синяя пунктирные линии показывают популяции R1 и R2 с различными активностями NMD. Д. Активность NMD, измеренная по флуоресценции репортера в указанных клеточных линиях. Приведены усредненные данные для 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением.

### 3.3.5 Тестирование репортера для независимого от сплайсинга NMD в линии клеток млекопитающих

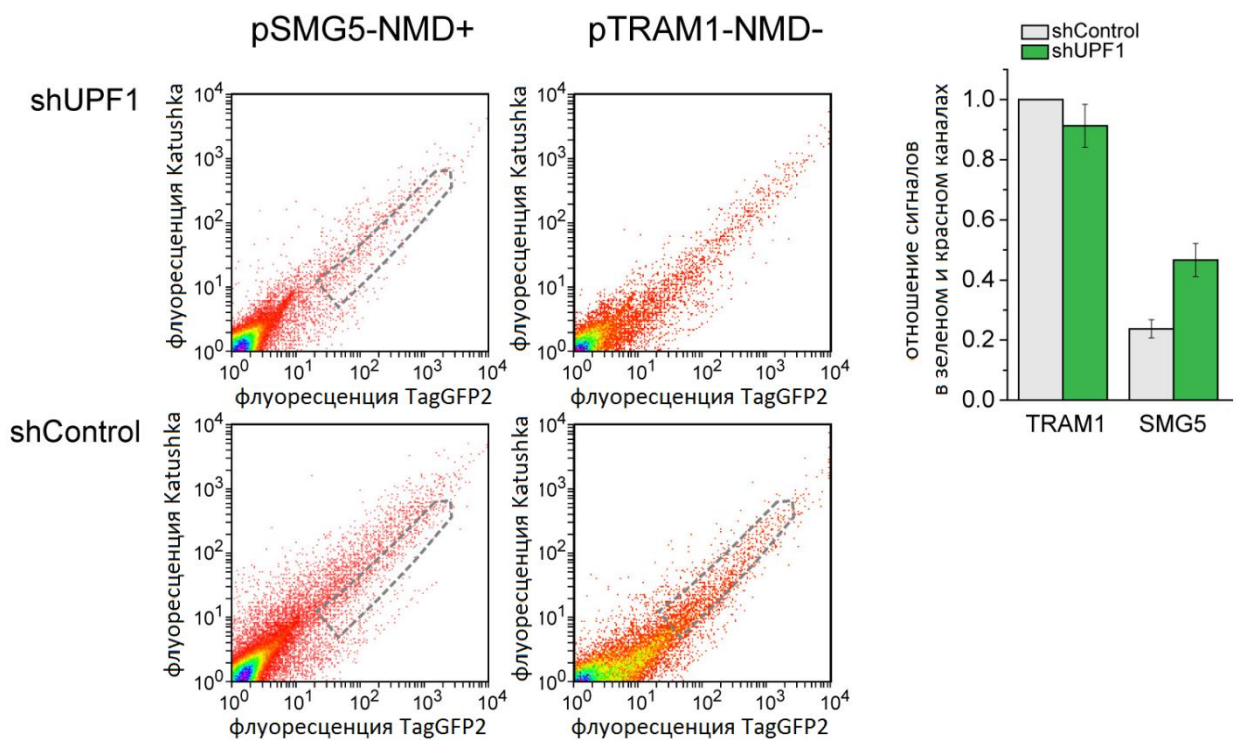
Чтобы протестировать репортер для независимого от сплайсинга NMD, клетки HeLa и HEK293T транзientно трансфицировали конструкциями pSMG5-NMD<sup>+</sup> или pTRAM1-NMD<sup>-</sup> и анализировали методом проточной цитофлуориметрии (Рисунок 3.17), как описано выше для репортера зависимого от сплайсинга NMD. Среднее отношение интенсивностей флуоресценции в зеленом и красном канале для образцов клеток HeLa и HEK293, трансфицированных конструкцией pTRAM1-NMD<sup>-</sup>, было в  $6,3 \pm 0,5$  и  $4,5 \pm 0,3$  раза выше по сравнению с отношением для образцов HeLa и HEK293, трансфицированных конструкцией pSMG5-NMD<sup>+</sup>, соответственно (Рисунок 3.17). Чтобы проверить, что наблюдаемое падение сигнала флуоресценции в зеленом канале было обусловлено активностью NMD, мы использовали ингибирование активности NMD под действием кофеина и кшРНК против UPF1. Как и ожидалось, обработка клеток HEK293T кофеином приводила к примерно двукратному повышению отношения интенсивностей флуоресценции в зеленом и красном канале для образцов клеток, трансфицированных pSMG5-NMD<sup>+</sup> (Рисунок 3.17). Ко-трансфекция репортерными плазмидами с pshUPF1 привела к сильному уменьшению различий во флуоресценции между клетками, трансфицированными pSMG5-NMD<sup>+</sup> и pTRAM1-NMD<sup>-</sup> ( $2,5 \pm 0,2$  раза; Рисунки 3.14 и 3.15), что соответствовало падению активности NMD. Контрольная кшРНК не изменяла флуоресценцию репортера. Анализ клеток HEK293T, трансфицированных репортерными конструкциями pSMG5-NMD<sup>+</sup> и pTRAM1-NMD<sup>-</sup>, методом количественной ОТ-ПЦР показал увеличение уровня транскрипта, кодирующего TagGFP2, в  $4,7 \pm 0,8$  раз в контрольном образце pTRAM1-NMD<sup>-</sup> по сравнению pSMG5-NMD<sup>+</sup>, что соответствовало значению, измеренному с помощью анализа флуоресценции. Обработка клеток ингибитором NMD CHX, как и ожидалось, приводила к увеличению уровня транскрипта, кодирующего TagGFP2, в образце pSMG5-NMD<sup>+</sup>. (Рисунок 3.17).

Мы пришли к выводу, что в клетках HEK293T и HeLa активность NMD, опосредуемая длинным 3'НТО из SMG5, в 2–3 раза ниже по сравнению с активностью зависимого от сплайсинга NMD (Рисунки 3.12 и 3.17 для сравнения с репортером pNMD<sup>+/-</sup>).



**Рисунок 3.17** Измерение активности независимого от сплайсинга NMD в клетках с помощью разработанного репортера. **А. и Б.** Анализ клеток HeLa (**А**) и HEK293Т (**Б**), транзientно трансфицированных конструкциями pSMG5-NMD+ (слева) или pTRAM1-NMD- (справа), методом проточной цитофлуориметрии. Каждая точка соответствует отдельной трансфицированной клетке. Цвет точек на рисунке отражает плотность событий в данной области координат. Анализ методом проточной цитофлуориметрии проводили для образцов при одинаковых настройках цитофлуориметра, как описано ранее. Для наглядности сравнения область, в которой группируются клетки, трансфицированные контрольной конструкцией pTRAM1-NMD-, выделена пунктиром. **В. и Г.** Активность NMD клетках HeLa или HEK293Т, обработанных или не обработанных кофеином, кшРНК против UPF1 (shUPF1) или циклогексимидом (CHX). Данные получены с помощью анализа флуоресценции репортера (**В**) или количественной ПЦР (**Г**). Приведены усредненные данные для 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением.





**Рисунок 3.18** Эффект ингибирования NMD под действием *shUPF1* на флуоресценцию репортера *SMG5/TRAM1*. Анализ клеток HEK293T, транзientно трансфицированных конструкциями *pSMG5-NMD+* (слева) или *pTRAM1-NMD-* (справа), методом проточной цитофлуориметрии. Каждая точка соответствует отдельной трансфицированной клетке. Цвет точек на рисунке отражает плотность событий в данной области координат. Анализ методом проточной цитофлуориметрии проводили для образцов при одинаковых настройках цитофлуориметра, как описано ранее. Для наглядности сравнения область, в которой группируются клетки, трансфицированные контрольной конструкцией *pTRAM1-NMD-*, выделена пунктиром. График справа показывает нормированное отношение интенсивности флуоресценции в зеленом и красном каналах (значение отношения для обработанного контрольной плазмидой *shControl* образца *pTRAM1-NMD-* принимали за 1) Приведены усредненные данные для 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением.

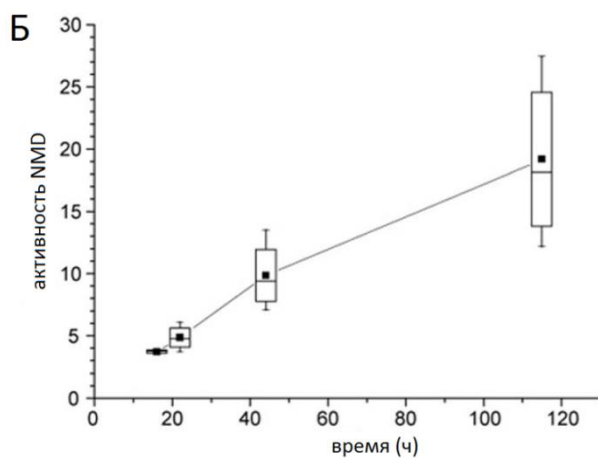
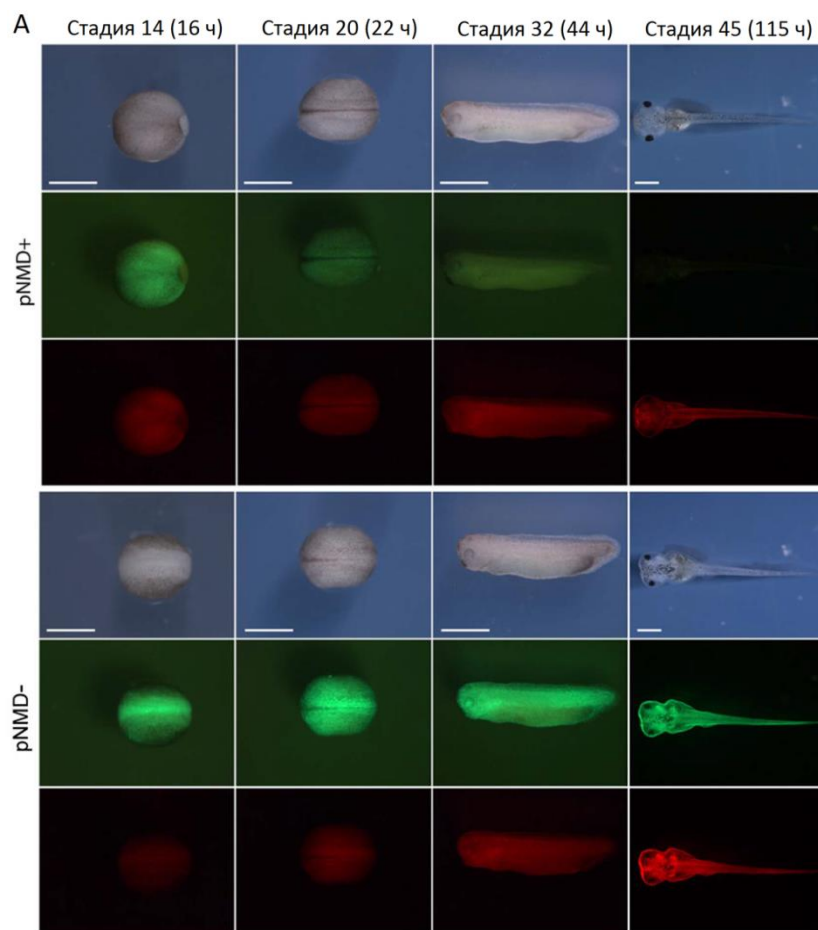
### 3.4 Оценка возможности применения разработанного репортера активности опосредуемого сплайсингом NMD в трансгенных животных на примере эмбрионов шпорцевых лягушек *Xenopus laevis*

Работа с эмбрионами *Xenopus laevis* проводилась в Лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН.

Репортер опосредуемого сплайсинга NMD имел значительно больший динамический диапазон по сравнению с репортером на основе длинного 3'НТО, поэтому он больше подходил для применения в сложных экспериментальных моделях *in vivo*. Репортерные конструкции *pNMD+* и *pNMD-* были протестированы в трансгенных эмбрионах *Xenopus laevis*. Неожиданно, в трансгенных эмбрионах, несущих репортер

pNMD+, наблюдался относительно высокий уровень флуоресценции в зеленом канале в начале нейруляции (Рисунок 3.19). Сигнал TagGFP2 был примерно в 4 раза ниже по сравнению с эмбрионами, несущими pNMD- (уровень флуоресценции в зеленом канале нормализовали на флуоресценцию *Katushka* для каждого эмбриона). Однако далее наблюдали прогрессивное уменьшение флуоресценции TagGFP2 в эмбрионах, несущих конструкцию pNMD+. Наблюдаемые результаты позволили нам предположить, что активность NMD является низкой на ранних этапах развития эмбрионов *Xenopus*, и затем повышается в процессе развития, достигая значений примерно 20 раз к стадии 45 (Рисунок 3.19). Чтобы проверить, что сигнал TagGFP2, наблюдаемый для конструкции pNMD+ в эмбрионах *Xenopus*, регулируется NMD, в Лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза использовали подавление ключевого фактора NMD UPF1. Для этого применяли специфическое блокирование трансляции антисмысловыми морфолино олигонуклеотидами (МО) [150,151]. Для этой цели в эмбрионы совместно вводили плазмиду pNMD+ и специфичный МО против мРНК UPF1. В результате использования специфичного МО в головастиках, развившихся из обработанных МО эмбрионов, наблюдали падение активности NMD в 2,6 раз по сравнению с эмбрионами, которым вводили конструкцию pNMD+ с контрольным misUPF1 МО.

Таким образом, с использованием разработанных репортерных конструкций в Лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза было показано увеличение активности NMD в эмбрионах *Xenopus* на стадиях с 14 по 45. Необходимо отметить, что благодаря неинвазивности измерения с помощью флуоресценции динамику активности NMD удалось наблюдать в отдельных эмбрионах в процессе их развития. Полученные результаты косвенно противоречат данным о присутствии ингибирующей NMD микроРНК miR-128 в эмбрионах *Xenopus* после стадии 23, исходя из которых можно ожидать снижение активности NMD в ходе развития [60]. Возможно, подавление активности NMD на ранних этапах развития эмбрионов *Xenopus* обусловлено другими механизмами, не связанными с miR-128. Для подтверждения полученных данных требуются дополнительные исследования, которые выходят за рамки настоящей работы.



**Рисунок 3.19** Измерение активности зависимо от сплайсинга NMD с помощью разработанного репортера в эмбрионах *Xenopus*. А. Флуоресцентные микрофотографии трансгенных эмбрионов, экспрессирующих рNMD+ (верхние изображения) или рNMD- (серия изображений ниже). Эмбрионы фотографировали в режиме световой микроскопии (верхний ряд изображений) и в красном и зеленом каналах флуоресценции (нижний и средний ряды изображений, соответственно). Все эмбрионы снимали при одинаковых настройках за исключением стадии 45, на которой экспозиции были уменьшены для недопущения значений сигнала, выходящих за пределы динамического диапазона детекции. Масштабная линейка: 1 мм. Б. Изменение активности NMD в ходе развития *Xenopus*. Приведены значения для 7 эмбрионов из 3 независимых экспериментов (показаны среднее значение, медиана, стандартное отклонение, а также минимальное и максимальное значения).

### 3.5 Применение интрона 2 гена $\beta$ -глобина человека для усиления экспрессии химерных генов

Ранее при тестировании контрольных репортерных конструкций рNMD– и рNMD–(i–) мы обнаружили, что присутствие сплайсируемого интрона в 3'НТО транскрипта, кодирующего TagGFP2, в конструкции рNMD– приводило к почти двукратному увеличению экспрессии TagGFP2 по сравнению с безинтронной конструкцией рNMD–(i–). Исходя из этого наблюдения, мы решили исследовать возможность увеличения гетерологичной экспрессии в клетках млекопитающих при включении интронов в 3'-нетранслируемую область соответствующего гена.

Установлено влияние интронов и их вырезания на многие аспекты метаболизма РНК, такие как полиаденилирование пре-мРНК, экспорт мРНК из ядра и ее распад [152]. Эти эффекты могут привести к разному уровню экспрессии содержащих интроны и безинтронных вариантов генетических конструкций [153,154].

Для увеличения гетерологичной экспрессии генетических конструкций в настоящее время предложено включать интроны в 5'-нетранслируемую область химерных генов [155,156,157], а также непосредственно в кодирующую последовательность гена [158]. При этом экспрессия, как правило, усиливается в 2–10 раз [159], а в некоторых случаях может составлять и большую величину [160].

Механизм опосредованного интронами усиления экспрессии до сих пор не ясен [159]. Предложенная недавно модель, объясняющая данный феномен, предполагает, что усиление экспрессии не должно зависеть от места расположения интрона в пре-мРНК [161]. По некоторым данным, сплайсинг усиливает трансляцию в клетках млекопитающих за счет присутствия на зрелой мРНК комплексов EJC и связанных с ними белков Upf1, Upf2 и Upf3b, являющихся факторами NMD [162]. Из литературных данных также известно, что интрон 2 гена  $\beta$ -глобина необходим для его экспрессии в гетерологичных условиях [163]. Для поддержания высокого уровня экспрессии  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобинов в трансгенных организмах необходимо наличие АТ-богатой последовательности интрона 2, с которой связывается ряд транскрипционных факторов [164]. Однако в литературе, напротив, описано либо явление ослабления экспрессии генетических конструкций при введении различных сплайсируемых интронов в 3'-нетранслируемую область химерных генов [165], либо отсутствие эффекта усиления экспрессии [159,166].

В некоторых случаях включение интронов в 3'-нетранслируемую область химерных генов может приводить к деградации синтезированных молекул мРНК под

действием NMD. В таком случае при введении интрона в 3'-нетранслируемую область гена эффект усиления экспрессии будет скомпенсирован процессом распада мРНК, что может привести к неверной интерпретации эффекта включения интронов в 3'-нетранслируемую область химерных генов.

Описан процесс активации криптоических акцепторных сайтов сплайсинга внутри кодирующей последовательности химерного гена под действием интрона в 5'-нетранслируемой области, приводящий к сбою рамки считывания [167]. Это делает предпочтительным введение усиливающего экспрессию интрона в 3'-нетранслируемую область химерного гена.

Наблюдаемый эффект увеличения экспрессии в присутствии сплайсируемого интрона в 3'НТО транскрипта был использован для усиления экспрессии дестабилизированного варианта флуоресцентного белка TurboYFP (TurboYFP-dest) с высокой скоростью деградации в клетках, используемого для отслеживания быстрых изменений активности промоторов. Белок TurboYFP дестабилизирован слиянием с фрагментом последовательности орнитиндекарбоксилазы (аминокислотные остатки 422–461, так называемый мотив PEST), обеспечивающим быструю деградацию TurboYFP с периодом полураспада 1–1,5 ч и низкую концентрацию при экспрессии в клетках млекопитающих [168].

Фрагмент гена  $\beta$ -глобина, несущий интрон 2, клонировали в вектор после кодирующей последовательности белка TurboYFPdest. При этом мРНК химерного гена с интроном в 3'-некодирующей области конструировали устойчивой к NMD, оставляя менее 50 bp между стоп-кодоном и донорным сайтом сплайсинга интрона. Полученными конструкциями и исходными конструкциями без интрона временно трансфицировали клетки HEK293T. Анализ клеток через 24 ч после трансфекции методом проточной цитофлуориметрии показал, что средняя интенсивность флуоресценции клеток, содержащих вектор с последовательностью интрона, в  $1,7 \pm 0,2$  раза выше относительно клеток, несущих исходную конструкцию TurboYFPdest без интрона.

Мы считаем, что показанный метод может быть использован для увеличения уровня экспрессии в гетерологичных системах в тех случаях, когда включение интронов в 5'-нетранслируемую область гена является неприемлемым (например, в случае наличия в кодирующей части гена акцепторных сайтов сплайсинга).

## ВЫВОДЫ

1. Показана возможность использования пары флуоресцентных белков TagGFP2 и Katushka для мониторинга процессинга РНК на уровне единичных живых клеток на примере флуоресцентного репортера альтернативного сплайсинга целевого гена.

2. Предложен метод количественного анализа нонсенс-опосредованной деградации мРНК (NMD) в живых клетках с помощью флуоресцентных белков TagGFP2 и Katushka. Созданы и успешно апробированы флуоресцентные репортеры сплайсинг-зависимого и сплайсинг-независимого каскадов NMD.

3. Разработанные репортеры использовали для измерения активности NMD в различных биологических моделях. Для сплайсинг-зависимого NMD показана высокая активность в культурах клеток человека HEK293T и HeLa Kyoto, и существенно сниженная активность в эмбриональных стволовых клетках (ES) и эмбриональных фибробластах (MEF) мыши. Впервые продемонстрирована сильная гетерогенность активности NMD в культивируемых до высокой плотности клетках HEK293T. Показано, что в клетках HEK293T и HeLa Kyoto активность сплайсинг-независимого NMD в 2–3 раза ниже по сравнению со сплайсинг-зависимым NMD. На примере трансгенных шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* показана возможность применения разработанного репортера NMD для неинвазивной оценки активности NMD в ходе эмбрионального развития.

4. Предложен метод увеличения уровня экспрессии химерных конструкций в клетках млекопитающих введением интрона в 3'-нетранслируемую область целевого гена.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа была посвящена созданию новых флуоресцентных инструментов для количественной неинвазивной оценки альтернативного сплайсинга и нонсенс-зависимой деградации на уровне отдельных клеток с помощью флуоресцентных белков.

Нами была показана возможность использования пары флуоресцентных белков TagGFP2 и Katushka для создания генетических репортерных конструкций для количественной оценки альтернативного сплайсинга на уровне мРНК с помощью репортерных минигенов, в которых последовательности, кодирующие флуоресцентные белки, функционально соединены с фрагментами эукариотических генов. Белки давали спектрально различимые сигналы, при этом включение в анализ второго флуоресцентного белка и использование контрольной конструкции для установления базового уровня соотношения интенсивностей флуоресценции в двух каналах позволяло количественно оценить активность процесса на уровне отдельных клеток.

Мы применили схожий принцип для конструирования репортерных конструкций для измерения активности процесса нонсенс-зависимой деградации мРНК (NMD) на уровне отдельных клеток.

Были сконструированы репортерные и контрольные плазмиды для оценки активности зависимого от сплайсинга NMD и независимого от сплайсинга NMD в клетках млекопитающих *in vivo*. Метод представлял собой логическое развитие предыдущих флуоресцентных и люминесцентных репортеров активности NMD, которые в отличие от разработанного метода не позволяли количественно оценивать активность процесса на уровне отдельных клеток. Мы использовали два флуоресцентных белка, один из которых кодируется мРНК, который является субстратом NMD, а второй используется для контроля уровня экспрессии и эффективности трансфекции. Это особенно важно для сложных экспериментальных моделей с потенциально гетерогенным по времени и для различных клеток паттерном активности NMD.

Чтобы проверить способность разработанной нами репортерной системы детектировать изменения активности NMD, мы протестировали полученные конструкции с использованием различных ингибиторов NMD. Во всех случаях наблюдался ожидаемый ответ репортера на воздействие ингибитора. Для верификации полученных значений активности NMD мы измерили активность процесса независимым стандартным методом в тех же экспериментальных условиях и показали, что измеренные по флуоресценции репортера значения активности NMD совпадали со значениями, определенными

классическим методом количественной ОТ-ПЦР. Анализ стабильности репортерного транскрипта-мишени NMD показал, что он существенно дестабилизирован, обработка ингибитором NMD приводила к его стабилизации, что доказывает, что его распад опосредован NMD. Проведенные эксперименты позволяют заключить, что разработанная репортерная система обеспечивает надежный метод измерения активности NMD.

Разработанные конструкции использовали для измерения активности NMD в различных линиях клеток млекопитающих и выявили линии клеток с высокой (HEK293T и HeLa) и относительно низкой (MEF и ES) активностью NMD. Полученные данные хорошо согласуются с показанными ранее различиями активности NMD в различных линиях клеток. Нам также удалось наблюдать отчетливую гетерогенность активности NMD в культивируемых до высокой плотности клетках HEK293T. Мы предположили, что потенциальным объяснением наблюдаемого феномена является повышение уровня кальция при контактном ингибировании роста клеток. В клетках HEK293T и HeLa активность NMD, опосредуемая длинным 3'НТО из SMG5, была в 2–3 раза ниже по сравнению с активностью зависимого от сплайсинга NMD.

Разработанный метод может быть особенно полезен в случае сложных биологических моделей, например, при исследовании регуляции процесса NMD в ходе развития. На примере трансгенных эмбрионов *Xenopus* нами показана возможность применения разработанного репортера зависимого от сплайсинга NMD для отслеживания активности NMD в динамике.

Предложенный репортер активности NMD потенциально может быть модифицирован для конкретных экспериментальных задач. Например, для оценки активности NMD в целевых популяциях клеток в многоклеточных организмах вместо промотора CMV могут быть использованы промоторы, активные в определенных типах клеток. Кроме того, на основе разработанных репортерных конструкций легко получить репортеры для различных вариантов пути NMD. В работе мы получили варианты репортера для зависимого от сплайсинга NMD и NMD, запускаемого длинным 3'НТО. Так как механизм распознавания ПСК одинаков для всех эукариот, полученные репортерные конструкции можно использовать во множестве биологических моделей.

Для специфической оценки активности других ветвей процесса NMD вместо фрагмента гена  $\beta$ -глобина могут быть использованы фрагменты других генов [51,169]. Кроме того, предложенная методика с использованием двухпромоторных репортеров, кодирующих два флуоресцентных белка, потенциально может быть использована для количественной оценки активности других процессов деградации РНК [170,171].



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДМСО – диметилсульфоксид  
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
кшРНК – короткая шпилечная РНК  
НТО – нетранслируемая область  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота  
ОРС – открытая рамка считывания  
ОТ-ПЦР – обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция  
ПСК – преждевременный стоп-кодон  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РНК – рибонуклеиновая кислота  
ТЕМЕД -  
Трис – трис(гидроксиметил)аминометан  
тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота  
ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота
- AMD – актиномицин Д  
АТСС – Американская коллекция клеточных культур  
АТР – аденозинтрифосфат  
ВАРТА-АМ – 1,2-бис(2-аминофенокси)этан-N, N, N', N'-тетрауксусной кислоты тетраацетоксиметиловый эфир  
bp – пара оснований  
СНХ – циклогексимид  
St – пороговый цикл  
DMEM – модифицированная по методу Дульбекко среда Игла  
EJ – место соединения экзонов при сплайсинге  
EJC – комплекс белков вблизи места соединения экзонов при сплайсинге  
ES клетки – эмбриональные стволовые клетки  
FBS – бычья эмбриональная сыворотка  
GFP – зелёный флуоресцентный белок  
HEK293T – линия клеток человеческой эмбриональной почки 293T  
HeLa – линия клеток раковой опухоли шейки матки пациентки по имени Henrietta Lacks

kb – тысячи пар оснований  
LIF – ингибирующий лейкемию фактор  
MEF – мышинные эмбриональные фибробласты  
NMD – нонсенс-зависимая деградация РНК  
PAGE – полиакриламидный гель  
PBS – фосфатный буферный солевой раствор  
PIG3 – индуцируемый p53 ген 3  
SDS – додецилсульфат натрия  
WM – вортманнин

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blencowe B.J. Alternative splicing: new insights from global analyses.// *Cell*. 2006. Vol. 126. P. 37–47.
2. Shin C. Manley J.L. Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing.// *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. Vol. 5. P. 727–738.
3. Orengo J.P., Bundman, D., Cooper, T.A. A bichromatic fluorescent reporter for cell based screens of alternative splicing.// *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34. P. e148.
4. Lander, E.S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome.// *Nature*. 2001. Vol. 409. P. 860–921.
5. Modrek B., Lee C. A genomic view of alternative splicing.// *Nat. Genet.* 2002. Vol. 30. P. 13–19.
6. Barash Y. et al. Deciphering the splicing code.// *Nature*. 2010. Vol. 465. P. 53–59.
7. Faustino N.A., Cooper T.A. Pre-mRNA splicing and human disease.// *Genes Dev.* 2003. Vol. 17. P. 419–437.
8. Cartegni L. et al. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing.// *Nature Rev. Genet.* 2002. Vol. 3. P. 285–298.
9. Lewis B. P. et al. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2003. Vol. 100. P. 189–192.
10. Shui A.-B. et al. Messenger mRNA regulation: to translate or to degrade.// *EMBO J.* 2008. Vol. 27. P. 471-481.
11. Moore M.J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs.// *Science*. 2005. Vol. 309. P. 1514–1518.
12. Schell T. et al. Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense-mediated decay pathway.// *Genome Biol.* 2002. Vol. 3. P. 1006.1–1006.6.
13. Dreyfuss G. et al. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry.// *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. Vol. 3. P. 195–205.
14. Maquat L.E. Nonsense mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics.// *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. Vol. 5. P. 89–99.

15. Amrani N. et al. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem.// *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. Vol. 7. P. 415–425.
16. Chang Y.-F. et al. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway.// *Ann. Rev. Biochem.* 2007. Vol. 76. P. 51–74.
17. Bhuvanagiri M. et al. NMD: RNA biology meets human genetic medicine.// *Biochem. J.* 2010. Vol. 430. P. 365-377.
18. Li S. and Wilkinson M.F. Nonsense surveillance in lymphocytes.// *Immunity.* 1998. Vol. 8. P. 135-141.
19. Holbrook J. A. et al. Nonsense-mediated decay approaches the clinic.// *Nat. Genet.* 2004. Vol. 36. P. 801–808.
20. Mendell J.T. et al. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise.// *Nat. Genet.* 2004. Vol. 36. P. 1073–1078.
21. Isken O. and Maquat L. E. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation.// *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008. Vol. 9. P. 699–712.
22. Khajavi M. et al. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease.// *Eur. J. Hum. Genet.* 2006. Vol. 14. P. 1074-1081.
23. Frischmeyer P., Dietz H. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease.// *Hum. Mol. Genet.* 1999. Vol. 8, № 10. P. 1893-1900.
24. Medghalchi, S.M. et al. Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability.// *Hum. Mol. Genet.* 2001. Vol. 10. P. 99–105.
25. Behm-Ansmant I. et al. mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons.// *FEBS Letters.* 2007. Vol. 581. P. 2845-2853.
26. Fukuhara N. et al. SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense mediated mRNA decay pathway.// *Mol. Cell.* 2005. Vol. 17. P. 537-547.
27. Rehwinkel J. et al. Nonsense-mediated mRNA decay: target genes and functional diversification of effectors.// *Trends Biochem. Sci.* 2006. Vol. 31. P. 639–646.
28. Le Hir H. et al. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay.// *EMBO J.* 2001. Vol. 20. P. 4987-4997.
29. Ohnishi T. et al. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing SMG-5 and hSMG-7.// *Mol. Cell.* 2003. Vol. 12. P. 1187–1200.

30. Bhattacharya, A. et al. Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay.// *RNA*. 2000. Vol. 6. P. 1226–1235.
31. Yamashita A. et al. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay.// *Genes Dev*. 2001. Vol. 15. P. 2215–2228.
32. Lykke-Andersen J. et al. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon.// *Cell*. 2000. Vol. 103. P. 1121–1131.
33. Mendell J.T. et al. Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts.// *Science*. 2002. Vol. 298. P. 419–422.
34. Azzalin C.M. et al. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends.// *Science*. 2007. Vol. 318. P. 798–801.
35. Kashima I. et al. Binding of a novel SMG1-UPF1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon-exon junction complex triggers UPF1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay.// *Genes Dev*. 2006. Vol. 20. P. 355–367.
36. Mendell J.T. et al. Novel Upf2 orthologues suggest a functional link between translation initiation and nonsense surveillance complexes.// *Mol. Cell. Biol*. 2000. Vol. 20. P. 8944–8957.
37. Serin G. et al. Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4).// *Mol. Cell. Biol*. 2001. Vol. 21. P. 209–223.
38. He F. et al. Interaction between Nmd2p and Upf1p is required for activity but not for dominant-negative inhibition of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in yeast.// *RNA*. 1996. Vol. 2. P. 153–170.
39. Kadlec J. et al. The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3.// *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2004. Vol. 11. P. 330–337.
40. Kunz J.B. et al. Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation.// *RNA*. 2006. Vol. 12. P. 1015–1022.
41. Chan W.K. et al. A UPF3-mediated regulatory switch that maintains RNA surveillance.// *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2009. Vol. 16. P. 747–753.
42. Gehring N.H. et al. Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex.// *Mol. Cell*. 2003. Vol. 11. P. 939–949.

43. Clissold P. M. and Ponting C. P. PIN domains in nonsense-mediated mRNA decay and RNAi.// *Curr. Biol.* 2000. Vol. 10. P. R888–R890.
44. Glavan F. et al. Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex.// *EMBO J.* 2006. Vol. 25. P. 5117–5125.
45. Gatfield D. et al. Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways.// *EMBO J.* 2003. Vol. 22. P. 3960–3970.
46. Chiu S.Y. et al. Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1.// *RNA.* 2003. Vol. 9. P. 77–87.
47. Unterholzner L. and Izaurralde E. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay.// *Mol. Cell.* 2004. Vol. 16. P. 587–596.
48. Yamashita A. et al. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay.// *Genes. Dev.* 2009. Vol. 23. P. 1091–1105.
49. Hachet O. and Ephrussi A. *Drosophila* Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport.// *Curr. Biol.* 2001. Vol. 11. P. 1666–1674.
50. Gehring N.H. et al. The hierarchy of exon-junction complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay.// *PLoS Biol.* 2009. Vol. 7. P. e1000120.
51. Gehring N.H. et al. Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements.// *Mol. Cell.* 2005. Vol. 20. P. 65–75.
52. Shibuya T. et al. eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay.// *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004. Vol. 11. P. 346–351.
53. Ballut L. et al. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity.// *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. Vol. 12. P. 861–869.
54. Degot S. et al. Association of the breast cancer protein MLN51 with the exon junction complex via its speckle localizer and RNA binding module.// *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. P. 33702–33715.
55. Gehring N.H. et al. Disassembly of exon junction complexes by PYM.// *Cell.* 2009. Vol. 137. P. 536–548.

56. Longman D. et al. Mechanistic insights and identification of two novel factors in the *C. elegans* NMD pathway.// *Genes Dev.* 2007. Vol. 21. P. 1075–1085.
57. Buhler M. et al. EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin-mu mRNA depends on 3'-UTR length.// *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. Vol. 13. P. 462–464.
58. Amrani N. et al. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay.// *Nature.* 2004. Vol. 432. P. 112–118.
59. Hogg J.R., P. Goff S.P. Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay.// *Cell.* 2010. 143. P. 379–389.
60. Bruno I.G. et al. Identification of a microRNA that activates gene expression by repressing nonsense-mediated RNA decay.// *Mol. Cell.* 2011. Vol. 42. № 4. P. 500-510.
61. Nickless A. et al. Intracellular calcium regulates nonsense-mediated mRNA decay.// *Nat. Med.* 2014. Vol. 20. P. 961-966.
62. Neu-Yilik G. and Kulozik A.E. NMD: multitasking between mRNA surveillance and modulation of gene expression.// *Adv. Genet.* 2008. Vol. 62. P. 185–243.
63. Mitrovich Q.M. and Anderson P. mRNA surveillance of expressed pseudogenes in *C. elegans*.// *Curr. Biol.* 2005. Vol. 15. P. 963–967.
64. Lelivelt M.J. and Culbertson M.R. Yeast Upf proteins required for RNA surveillance effect global expression of the yeast transcriptome.// *Mol. Cell. Biol.* 1999. Vol. 19. P. 6710–6719.
65. Nicholson P. et al. Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors.// *Cell. Mol. LifeSci.* 2009. Vol. 67. P. 677–700.
66. Moriarty P.M. et al. Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathioneperoxidase 1 by aUGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA.// *Mol. Cell. Biol.* 1998. Vol. 18. P. 2932–2939.
67. Seyedali A., Berry M.J. Nonsense-mediated decay factors are involved in the regulation of selenoprotein mRNA levels during selenium deficiency.// *RNA.* 2014. Vol. 20. № 8. P. 1248-1256.
68. Chiu S.Y. et al. The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex.// *Genes Dev.* 2004. Vol. 18. P. 745–754.

69. Gardner L.B. Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response.// *Mol. Cell. Biol.* 2008. Vol. 28. P. 3729–3741.
70. Lareau L.F. et al. The coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay.// *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007. Vol. 623. P. 190-211.
71. Saltzman A.L. et al. Regulation of multiple core spliceosomal proteins by alternative splicing-coupled nonsense-mediated mRNA decay.// *Mol. Cell. Biol.* 2008. Vol. 28. P. 4320–4330.
72. Baek D. and Green P. Sequence conservation, relative isoform frequencies, and nonsense-mediated decay in evolutionarily conserved alternative splicing.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. Vol. 102. P. 12813–12818.
73. McGlincy N.J., Smith C.W. Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense?// *Trends Biochem. Sci.* 2008. Vol. 33. № 8. P. 385-93.
74. Jumaa H. and Nielsen P.J. The splicing factor SRp20 modifies splicing of its own mRNA and ASF/SF2 antagonizes this regulation.// *EMBO J.* 1997. Vol. 16. P. 5077–5085.
75. Lejeune F. et al. Alternative splicing of intron 3 of the serine/arginine-rich protein 9G8 gene. Identification of flanking exonic splicing enhancers and involvement of 9G8 as a trans-acting factor.// *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. P. 7850–7858.
76. Sureau A. et al. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs.// *EMBO J.* 2001. Vol. 20. P. 1785–1796.
77. Wollerton M.C. et al. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay.// *Mol. Cell.* 2004. Vol. 13. P. 91–100.
78. Cuccurese M. et al. Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate mammalian ribosomal gene expression.// *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33. P. 5965–5977.
79. Mitrovich Q.M. and Anderson P. Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*.// *Genes Dev.* 2000. Vol. 14. P. 2173–2184.
80. Ni J.Z. et al. Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay.// *Genes Dev.* 2007. Vol. 21. P. 708–718.
81. Yeo G.W. et al. Discovery and analysis of evolutionarily conserved intronic splicing regulatory elements.// *PLoS Genet.* 2007. Vol. 3. P. e85.



82. Zhang Z. et al. Noisy splicing, more than expression regulation, explains why some exons are subject to nonsense-mediated mRNA decay.// *BMC Biol.* 2009. Vol. 7. P. 23.
83. Green R.E. et al. Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes.// *Bioinformatics.* 2003. Vol. 19 Suppl 1. P. i118-121.
84. Weischenfeldt J. et al. NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements.// *Genes Dev.* 2008. Vol. 22. P. 1381–1396.
85. Guan Q. et al. Impact of nonsense-mediated mRNA decay on the global expression profile of budding yeast.// *PLoS Genet.* 2006. Vol. 2. P. e203.
86. Dahlseid J.N. et al. mRNA encoding telomerase components and regulators are controlled by UPF genes in *Saccharomyces cerevisiae*.// *Eukaryotic Cell.* 2003. Vol. 2. P. 134–142.
87. Azzalin C.M. and Lingner J. The double life of UPF1 in RNA and DNA stability pathways.// *Cell Cycle.* 2006. Vol. 5. P. 1496–1498.
88. Brumbaugh K.M. et al. The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells.// *Mol. Cell.* 2004. Vol. 14. P. 585–598.
89. Metzstein M.M. and Krasnow M.A. Functions of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in *Drosophila* development.// *PLoS Genet.* 2006. Vol. 2. № 12. P. e180.
90. Yoine M. et al. Arabidopsis UPF1 RNA helicase for nonsense-mediated mRNA decay is involved in seed size control and is essential for growth.// *Plant Cell Physiol.* 2006. Vol. 47. P. 572–580.
91. Kuzmiak H.A. and Maquat L.E. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges.// *Trends Mol. Med.* 2006. Vol. 12. P. 306–316.
92. Fackenthal J.D., Godley L.A. Aberrant RNA splicing and its functional consequences in cancer cells.// *Dis. Model Mech.* 2008. Vol. 1. P. 37-42.
93. Karam R. et al. The NMD mRNA surveillance pathway downregulates aberrant E-cadherin transcripts in gastric cancer cells and in CDH1 mutation carriers.// *Oncogene.* 2008. Vol. 27. P. 4255–4260.
94. Thein S.L. et al. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body  $\beta$ -thalassemia.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990. Vol. 87. P. 3924–3928.

95. Hall G.W. and Thein S. Nonsense codon mutations in the terminal exon of the  $\beta$ -globin gene are not associated with a reduction in  $\beta$ -mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant  $\beta$ -thalassemia.// *Blood*. 1994. Vol. 83. P. 2031–2037.
96. Rosenfeld P.J. et al. A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa.// *Nat. Genet.* 1992. Vol. 1. P. 209–213.
97. Sung C.H. et al. Rhodopsin mutations in autosomal dominant retinitis pigmentosa.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991. Vol. 88. P. 6481–6485.
98. Inoue K. et al. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations.// *Nat. Genet.* 2004. Vol. 36. P. 361–369.
99. Jouanguy E. et al. Interferon- $\gamma$ -receptor deficiency in an infant with fatal bacilli Calmette-Guer in infection.// *N. Engl. J. Med.* 1996. Vol. 335. P. 1956–1961.
100. Jouanguy E. et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection.// *Nat. Genet.* 1999. Vol. 21. P. 370–378.
101. Rivolta C. et al. Dominant Leber congenital amaurosis, cone-rod degeneration, and retinitis pigmentosa caused by mutant versions of the transcription factor CRX.// *Hum. Mutat.* 2001. Vol. 18. P. 488–498.
102. Schwabe G.C. et al. Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B.// *Am. J. Hum. Genet.* 2000. Vol. 67. P. 822–831.
103. Pusch M. Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLCN1.// *Hum. Mutat.* 2002. Vol. 19. P. 423–434.
104. Schneppenheim R. et al. Expression and characterization of von Willebrand factor dimerization defects in different types of von Willebrand disease.// *Blood*. 2001. Vol. 97. P. 2059–2066.
105. Millar D.S. et al. Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor X deficiency.// *Hum. Genet.* 2000. Vol. 106. P. 249–257.
106. Tassabehji M. et al. Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supra valvular aortic stenosis.// *Hum. Mol. Genet.* 1997. Vol. 6. P. 1029–1036.
107. Korkko J. et al. Analysis of the COL1A1 and COL1A2 genes by PCR amplification and scanning by conformation-sensitive gel electrophoresis identifies only COL1A1 mutations in 15

- patients with osteogenesis imperfect type I: identification of common sequences of null-allele mutations.// *Am. J. Hum. Genet.* 1998. Vol. 62. P. 98–110.
108. Willing M.C. et al. Premature chain termination is a unifying mechanism for COL1A1 null alleles in osteogenesis imperfect type I cell strains.// *Am. J. Hum. Genet.* 1996. Vol. 59. P. 799–809.
109. Li A. and Swift M. Mutations at the ataxia-telangiectasia locus and clinical phenotypes of A-T patients.// *Am. J. Med. Genet.* 2000. Vol. 92. P. 170–177.
110. Parsons D.W. et al. An 11 basepair duplication in exon 6 of the SMN gene produces a type I spinal muscular atrophy (SMA) phenotype: further evidence for SMN as the primary SMA-determining gene.// *Hum. Mol. Genet.* 1996. Vol. 5. P. 1727–1732.
111. Sossi V. et al. Premature termination mutations in exon 3 of the SMN1 gene are associated with exon skipping and a relatively mild SMA phenotype.// *Eur. J. Hum. Genet.* 2001. Vol. 9. P. 113–120.
112. Kerr T.P. et al. Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay?// *Hum. Genet.* 2001. Vol. 109. P. 402–407.
113. Rowntree R.K. and Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations.// *Ann. Hum. Genet.* 2003. Vol. 67. P. 471–485.
114. Tzoulaki I. et al. PAX6 mutations: genotype-phenotype correlations.// *BMC Genet.* 2005. Vol. 6. P. 27.
115. Monreal A.W. et al. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia.// *Nat. Genet.* 1999. Vol. 22. P. 366–369.
116. Chassaing N. et al. Mutations in EDAR account for one-quarter of non-ED1-related hypohidrotic ectodermal dysplasia.// *Hum. Mutat.* 2006. Vol. 27. P. 255–259.
117. Jackson S.N. et al. The diagnosis of Liddle syndrome by identification of a mutation in the beta subunit of the epithelial sodium channel.// *J. Med. Genet.* 1998. Vol. 35. P. 510–512.
118. Kerem E. et al. Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudo hypoaldosteronism.// *N. Engl. J. Med.* 1999. Vol. 341. P. 156–162.
119. Linde L. and Kerem B. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases.// *Trends Genet.* 2008. Vol. 24. P. 552–563.

120. Palmer E. et al. Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics.// *Nature*. 1979. Vol. 277. P. 148–150.
121. Bedwell D.M. et al. Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line.// *Nat. Med.* 1997. Vol. 3. P. 1280–1284.
122. Wilschanski M. et al. A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations.// *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000. Vol. 161. P. 860–865.
123. Wagner K.R. et al. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations.// *Ann. Neurol.* 2001. Vol. 49. P. 706–711.
124. Welch E.M. et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations.// *Nature*. 2007. Vol. 447. P. 87–91.
125. Du M. et al. PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105. P. 2064–2069.
126. Kiselev A.V. et al. Suppression of nonsense mutations in the Dystrophin gene by a suppressor tRNA gene.// *Mol. Biol.* 2002. Vol. 36. P. 43–47.
127. Atkinson J. and Martin R. Mutations to nonsense codons in human genetic disease: implications for gene therapy by nonsense suppressor tRNAs.// *Nucleic Acids Res.* 1994. Vol. 22. P. 1327–1334.
128. Alter J. et al. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression body wide and improves dystrophic pathology.// *Nat. Med.* 2006. Vol. 12. P. 175–177.
129. Dominski Z. and Kole R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993. Vol. 90. P. 8673–8677.
130. Mann C.J. et al. Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. Vol. 98. P. 42–47.
131. Usuki F. et al. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease.// *Ann. Neurol.* 2004. Vol. 55. P. 740–744.
132. Kuroyanagi H. et al. Transgenic alternative-splicing reporters reveal tissue-specific expression profiles and regulation mechanisms in vivo.// *Nat. Methods.* 2006. Vol. 3. P. 909–915.

133. Stoilov P. et al. A high-throughput screening strategy identifies cardiotoxic steroids as alternative splicing modulators.// *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 2008. Vol. 105. P. 11218–11223.
134. Ohno G. et al. STAR family RNA-binding protein ASD-2 regulates developmental switching of mutually exclusive alternative splicing in vivo.// *Genes Dev.* 2008. Vol. 22. P. 360–374.
135. Newman E.A. et al. Identification of RNA-binding proteins that regulate FGFR2 splicing through the use of sensitive and specific dual color fluorescence minigene assays.// *RNA.* 2006. Vol. 12. P. 1129–1141.
136. Paillusson A. et al. A GFP-based reporter system to monitor nonsense-mediated mRNA decay.// *Nucl. Acids Research.* 2005. Vol. 33 № 6. P. e54.
137. Boelz S. et al. A chemiluminescence-based reporter system to monitor nonsense-mediated mRNA decay.// *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2006. Vol. 349. P. 186–191.
138. Limaye A. et al. Manipulation of mouse embryonic stem cells for knockout mouse production.// *Curr. Protoc. Cell Biol.* 2009. Vol. 19. № 19.13 P. 1–24.
139. Noensie E.N., Dietz H.C. A strategy for disease gene identification through nonsense-mediated mRNA decay inhibition.// *Nat. Biotechnol.* 2001. Vol. 19. P. 434–439.
140. Martynova N. et al. Patterning the forebrain: FoxA4a/Pintallavis and Xvent2 determine the posterior limit of Xanf1 expression in the neural plate.// *Development.* 2004. Vol. 131. P. 2329–2338.
141. Nicholls C.D., Beattie T.L. Multiple factors influence the normal and UV-inducible alternative splicing of PIG3.// *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. Vol. 1779. P. 838–849.
142. Gurskaya N.G. et al. Coding region of far-red fluorescent protein Katushka contains a strong donor splice site.// *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2011. Vol. 37. P. 380–382.
143. Shcherbo D. et al. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging.// *Nat. Methods.* 2007. Vol. 4. P. 741–746.
144. Singh G. et al. A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay.// *PLoS Biol.* 2008. Vol. 6. P. e111.
145. Linde L. et al. The efficiency of nonsense-mediated mRNA decay is an inherent character and varies among different cells.// *Eur. J. Hum. Genet.* 2007. Vol. 15. P. 1156–1162.

146. Gardner L.B. Nonsense-mediated RNA decay regulation by cellular stress: implications for tumorigenesis.// *Mol. Cancer Res.* 2010. Vol. 8. P. 295–308.
147. Scotto C. et al. Calcium and S100B regulation of p53-dependent cell growth arrest and apoptosis.// *Mol. Cell. Biol.* 1998. Vol. 18. № 7. P. 4272-4281.
148. Coppelino M. et al. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion.// *Nature.* 1997. Vol. 286. P. 843–847.
149. Kwon M.S. et al. Calreticulin couples calcium release and calcium influx in integrin-mediated calcium signaling.// *Mol Biol Cell.* 2000. Vol. 11. № 4. P. 1433-1443.
150. Summerton J., Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties.// *Antisense Nucl. Acid Drug Dev.* 1997. Vol. 7. P. 187–195.
151. Heasman J. et al. Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach.// *Dev. Biol.* 2000. Vol. 222. P. 124–134.
152. Le Hir H. et al. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression.// *Trends Biochem. Sci.* 2003. Vol. 28. P. 215-220.
153. Li H.W. et al. Intronic enhancement of angiotensin II type 2 receptor transgene expression in vitro and in vivo.// *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. Vol. 336. № 1. P. 29–35.
154. Choi T. et al. A generic intron increases gene expression in transgenic mice.// *Mol. Cell. Biol.* 1991. Vol. 11. № 6. P. 3070–3074.
155. Morello L. et al. Testing the IMEter on rice introns and other aspects of intron-mediated enhancement of gene expression.// *J. Exp. Bot.* 2011. Vol. 62. P. 533–544.
156. Quilici L.S. et al. A minimal cytomegalovirus intron A variant can improve transgene expression in different mammalian cell lines.// *Biotechnol. Lett.* 2013. Vol. 35. P. 21–27.
157. Schambach A. et al. Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors.// *Mol. Ther.* 2000. Vol. 2. № 5. P. 435-45.
158. Lacy-Hulbert A. et al. Interruption of coding sequences by heterologous introns can enhance the functional expression of recombinant genes.// *Gene Ther.* 2001. Vol. 8. P. 649–653.
159. Rose A.B. Requirements for intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis*.// *RNA.* 2002. Vol. 8. P. 1444–1453.
160. Buchman A.R., Berg P. Comparison of intron-dependent and intron-independent gene expression.// *Mol. Cell. Biol.* 1988. Vol. 8. P. 4395–4405.

161. Moabbi A.M. et al. Role for gene looping in intron-mediated enhancement of transcription.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. Vol. 109. P. 8505–8510.
162. Nott A. et al. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex.// *Genes Dev.* 2004. Vol. 18. № 2. P. 210–222.
163. Jackson Ch.E. et al. Nuclear factor binding sites in human beta globin IVS2.// *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 28448–28456.
164. Bharadwaj R.R. et al. LCR-regulated transgene expression levels depend on the Oct-1 site in the AT-rich region of beta-globin intron-2.// *Blood.* 2003. Vol. 101. P. 1603–1610.
165. Evans M.J., Scarpulla R.C. Introns in the 3'-untranslated region can inhibit chimeric CAT and beta-galactosidase gene expression.// *Gene.* 1989. Vol. 84. P. 135–142.
166. Palmiter R.D. et al. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice.// *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991. Vol. 88. P. 478–482.
167. Dongmei C. et al. Alternative splicing attenuates transgenic expression directed by the apolipoprotein E promoter-enhancer based expression vector pLIV11.// *J. Lipid Res.* 2010. Vol. 51. P. 849–855.
168. Li X. et al. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter.// *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. P. 34970–34975.
169. Chan W.K. et al. An alternative branch of the nonsense-mediated decay pathway.// *EMBO J.* 2007. Vol. 26. P. 1820–1830.
170. Park E., Maquat L.E. Staufen-mediated mRNA decay.// *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2013. Vol. 4. № 4. P. 423-435.
171. Klauer A.A., van Hoof A. Degradation of mRNAs that lack a stop codon. P. a decade of nonstop progress.// *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2012. Vol. 3. № 5. P. 649-60.