

**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

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2015

Работа выполнена в лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук Лукьянов Константин Анатольевич

Официальные оппоненты:

Юлий Валерьевич Шидловский, доктор биологических наук, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии ИБГ РАН

Михаил Сергеевич Гельфанд, доктор биологических наук, заместитель директора по научным вопросам Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук

Ведущая организация

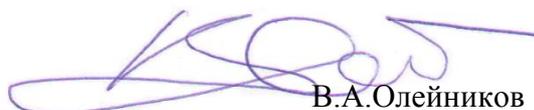
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук

Защита состоится «17» июня 2015 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН и на сайте www.ibch.ru.

Автореферат разослан _____

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук


В.А.Олейников

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Классические методы для изучения альтернативного сплайсинга и нонсенс-зависимой деградации мРНК включают анализ методом нозерн-блоттинг и обратную транскрипцию – полимеразную цепную реакцию. Современные высокопроизводительные подходы, такие как гибридизация с олигонуклеотидными чипами широкомасштабное секвенирование транскриптомов вместе с биоинформатической обработкой полученных результатов, позволяют проводить масштабный анализ альтернативного сплайсинга и NMD множества транскриптов. В последнее время было разработано несколько подходов для анализа альтернативного сплайсинга с использованием зеленого флуоресцентного белка (GFP) и других флуоресцентных белков. Как и другие методы анализа на основе флуоресцентных белков, они позволяют не инвазивно оценивать активность процесса *in vivo*. Однако 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.

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. Процесс NMD также позволяет объяснить различие в фенотипическом проявлении множества генетических заболеваний. 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 генетически кодируемых инструментов для исследования процессов процессинга и деградации мРНК, в частности, метода оценки процесса нонсенс-зависимой деградации мРНК на уровне отдельных клеток с помощью флуоресцентных белков.

Цели и задачи работы. 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*.

Научная новизна и практическая ценность работы. 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. Сконструированы репортерные и контрольные плазмиды для оценки активности зависимо от сплайсинга NMD и независимого от сплайсинга NMD в клетках млекопитающих *in vivo*. В отличие от разработанного метода предыдущие флуоресцентные и люминесцентные репортеры активности NMD не позволяли количественно оценивать активность процесса на уровне отдельных клеток. Это особенно важно для сложных экспериментальных моделей с потенциально гетерогенным по времени и для различных клеток паттерном 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. 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 зависимо 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 зависимо от сплайсинга NMD для отслеживания активности NMD в динамике. Так как механизм распознавания ПСК одинаков для всех эукариот, полученные репортерные конструкции можно использовать во множестве биологических моделей.

При тестировании контрольных репортерных конструкций мы обнаружили, что присутствие сплайсируемого интрона в 3'НТО транскрипта приводило к почти двукратному увеличению экспрессии по сравнению с безинтронной конструкцией. Исходя из этого наблюдения, мы предложили метод увеличения уровня экспрессии химерных конструкций в клетках млекопитающих введением интрона в 3'-нетранслируемую область целевого гена.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 103 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, заключения и списка литературы, включающего 171 ссылку. Диссертация содержит 22 рисунка и 3 таблицы.

Апробация работы. Работа прошла апробацию на Международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 55-летию Института биоорганической химии им. академиков Ю.А.Овчинникова и М.М.Шемякина РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А.Овчинникова (Москва, 15-19 сентября 2014 г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых журналах.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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-In-E(n+1)-TagGFP2 (Рис.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-ОРС-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 (Рис. 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 (Рис. 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. 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. Поэтому в работе использовали мутированный вариант Katushka без донорного сайта сплайсинга.

Миниген PIG3 (экзоны 3–5 и интроны между ними) клонировали между последовательностями, кодирующими флуоресцентные белки Katushka и TagGFP (конструкция pSplPIG), как показано на Рис.2. Также конструировали контрольную плазмиду pCtrlPIG, соответствующую нормально сплайсируемому транскрипту (Katushka-экзоны 3–5-TagGFP).

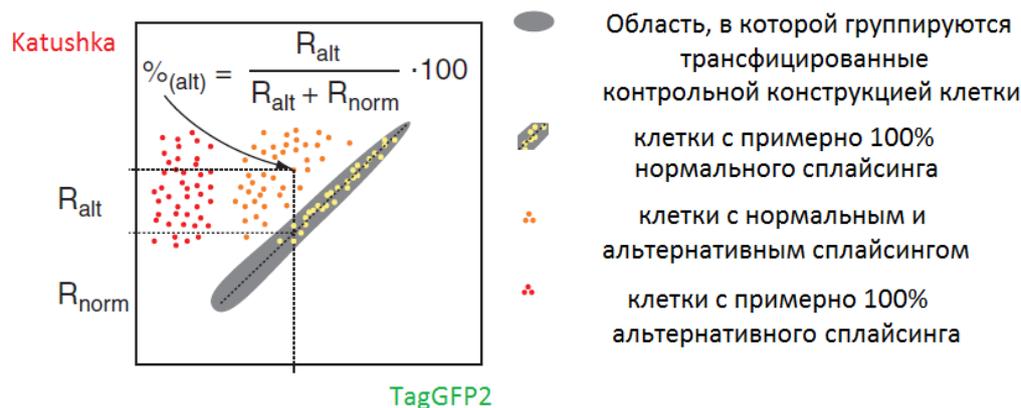


Рис. 1. Схема предложенного метода анализа альтернативного сплайсинга с помощью двух флуоресцентных белков. Схематичное изображение ожидаемых результатов при анализе трансфицированных клеток методом проточной цитофлуориметрии (график в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом и красном каналах). Процент нормальных и альтернативных транскриптов в каждой клетке может быть рассчитан с помощью приведенного уравнения.

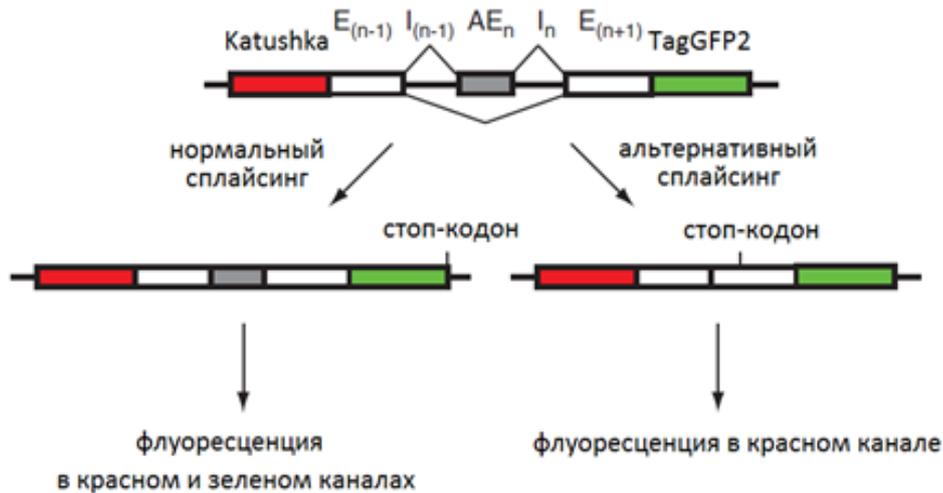


Рис. 2. Схема предложенного метода анализа альтернативного сплайсинга с помощью двух флуоресцентных белков. Трансляция нормального полноразмерного транскрипта (слева) дает TagGFP2 и Katushka, а трансляция альтернативно сплайсированного укороченного транскрипта (справа) дает только красный флуоресцентный белок Katushka.

Клетки НЕК293Т 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 (Рис.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) (Рис.3). Данные показывают, что уровень альтернативного сплайсинга минигена PIG3 в отдельных клетках НЕК293Т 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 (Рис.3). Были различимы два пика, соответствующие двум популяциям клеток НЕК293Т 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 НЕК293Т, 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 (Рис. 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.

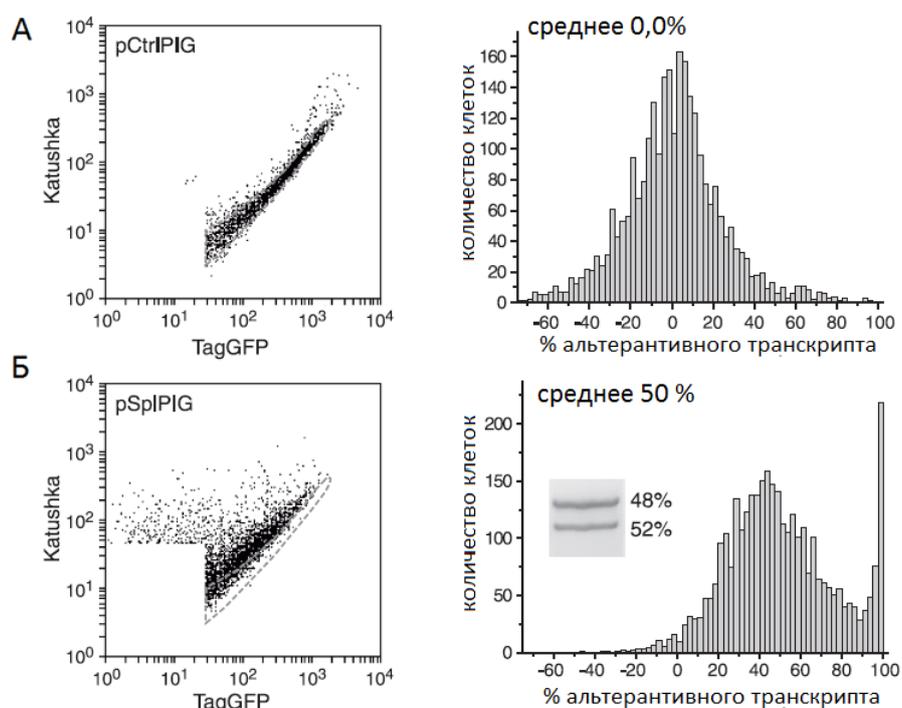


Рис. 3. Анализ клеток HEK293T, транзистентно трансфицированных плазмидами pSplPIG и pCtrlPIG. Приведены графики в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом и красном каналах. Область, соответствующая клеткам, трансфицированным конструкцией pCtrlPIG, выделена пунктирной линией на рисунке 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 соответствует нормальному транскрипту PIG3, нижняя полоса - альтернативно сплайсированному транскрипту без экзона 4. Процентные соотношения продуктов сплайсинга рассчитывали методом денситометрии с коррекцией на длину фрагментов ДНК. А. pCtrlPIG; Б. pSplPIG.

2. Разработка генетически кодируемых репортеров активности NMD

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, 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, рNMD⁺ и рNMD⁻, каждый несли два гена, кодирующие флуоресцентный белки, под контролем CMV промоторов (P_{CMV IE}), активных в эукариотических клетках, и терминаторов транскрипции (два ранних сигнала полиаденилирования мРНК вируса SV40) (Рис.4). Первый ген в обоих векторах кодировал дальне-красный флуоресцентный белок Katushka (TurboFP635). Второй ген кодировал зеленый флуоресцентный белок TagGFP2 и фрагмент гена β-глобина человека после стоп-кодона TagGFP2.

Чтобы сделать транскрипт, кодирующий зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, мишенью для зависящего от сплайсинга NMD, после стоп-кодона TagGFP2 вставляли фрагмент гена β-глобина человека, который включал фрагмент экзона 2, 233 нуклеотида экзона 3 и полноразмерный сплайсируемый интрон между ними. 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 β-глобина человека, в результате чего данный стоп-кодон распознавался в клетках млекопитающих как преждевременный, что делало данный транскрипт мишенью для зависящего 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 "рNMD⁻", в котором транскрипт, кодирующий зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, не был субстратом для NMD. Плазмида рNMD⁻ была идентична рNMD⁺ с тем исключением, что в ней присутствовал укороченный с 5'-конца фрагмент гена β-глобина человека с делецией части экзона 2 (Рис.4). В плазмиде рNMD⁻ 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 рNMD⁻, 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 "рNMD⁻(i-)", в котором транскрипт, кодирующий зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, не был субстратом для NMD. Плазмида рNMD⁻(i-) была идентична рNMD⁺ 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-(i-), 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+, ее последовательность была идентична последовательности соответствующего транскрипта, транскрибируемого с вектора pNMD-(i-).

Клетки, трансфицированные pNMD+, pNMD-(i-) или pNMD-, обладают зеленой и красной флуоресценцией. Трансфекция клеток с использованием контрольной репортерной конструкции pNMD- или pNMD-(i-) 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+, 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- (pNMD-(i-)) и pNMD+, можно использовать для прямого измерения активности NMD в исследуемой биологической модели.

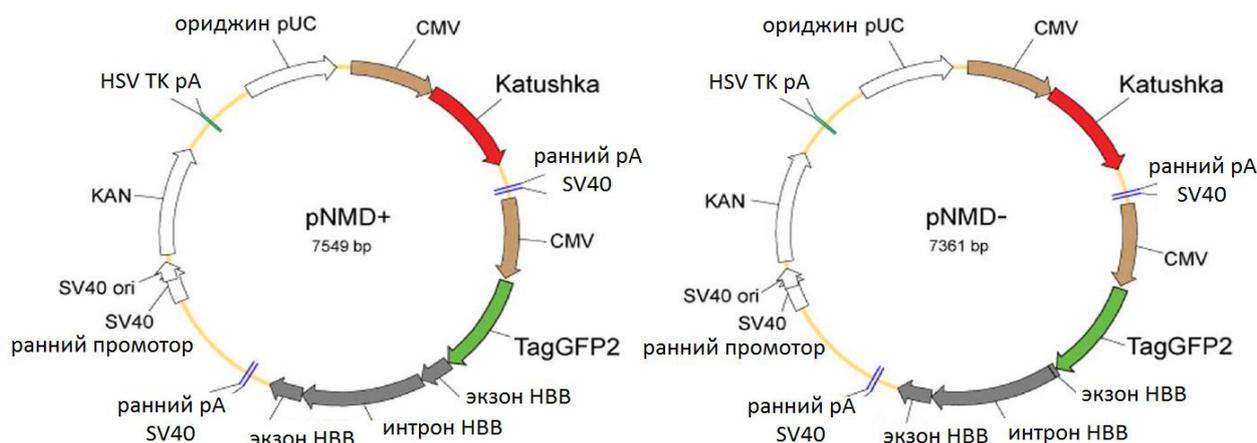


Рис. 4 Схематическое изображение репортерных конструкций pNMD+ и pNMD-. Приведены основные генетические элементы репортерных конструкций pNMD+ (слева) и pNMD- (справа). Коричневые стрелки – промоторы CMV. Красные стрелки – фрагменты ДНК, кодирующие дальне-красный флуоресцентный белок Katushka. Зеленые стрелки – фрагменты ДНК, кодирующие зеленый флуоресцентный белок TagGFP2. Серые стрелки – фрагменты гена β-глобина (HBB) человека. Конструкции векторов идентичны за исключением делеции в экзоне 2 фрагмента гена β-глобина.

В первой плазмиде, pNMD+, 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 плаزمидях

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 (Рис.5).

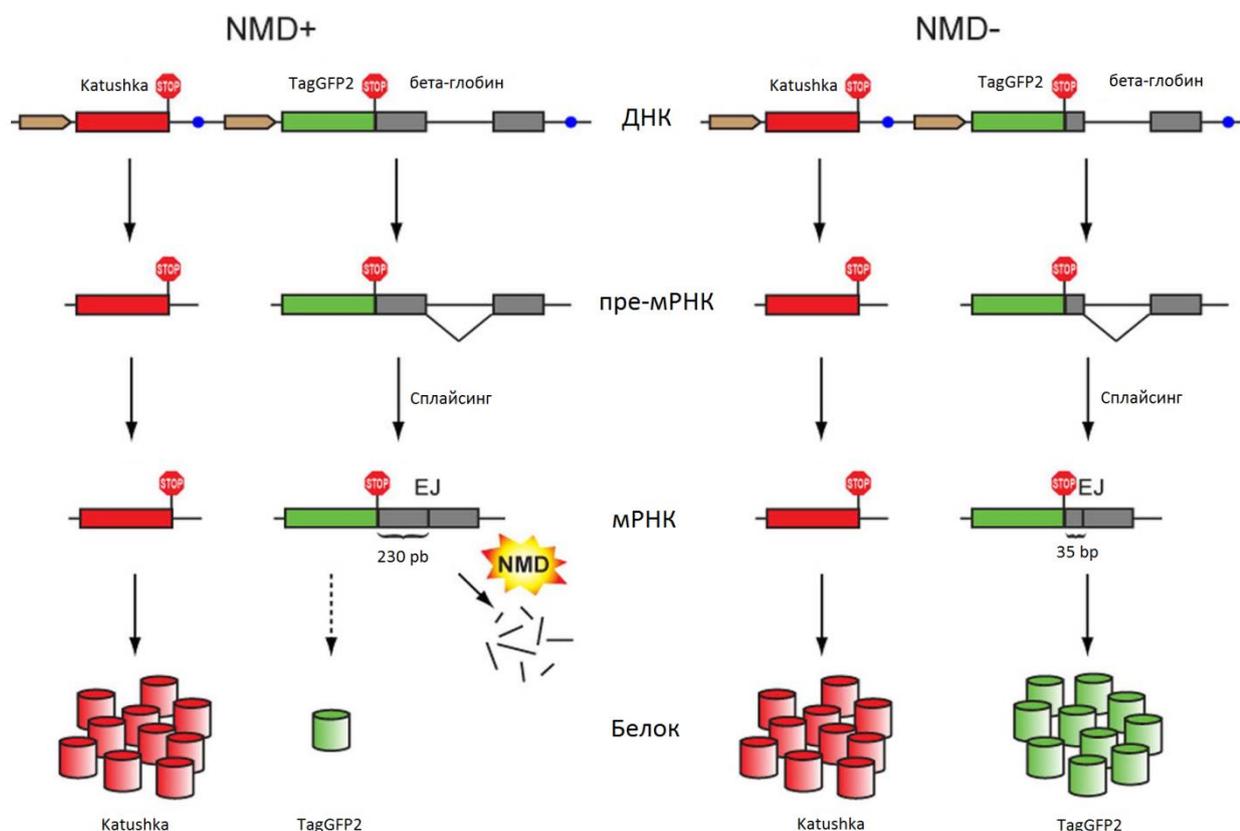


Рис. 5 Схематичное изображение разработанного метода анализа активности NMD. Плаزمида *rNMD+* (слева) кодирует два флуоресцентных белка; первый флуоресцентный белок (*TagGFP2*) кодируется транскриптом, который является мишенью для NMD, а второй флуоресцентный белок (*Katushka*) служит в качестве контроля 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 β -глобина человека, соответственно. Синие кружки – терминаторы транскрипции. Красные знаки STOP – стоп-кодона. Красные и зеленые цилиндры – транслированные белки *Katushka* и *TagGFP2*, соответственно.

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,

в то время как длинная 3'НТО из мРНК гена TRAM1 не вызывает NMD-распад мРНК. 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 TRAM, соответственно (Рис.6). Данные вектора являются флуоресцентными репортерами для пути NMD, в котором распознавание стоп-кодона как ПСК зависит от распознавания длинного 3'НТО.

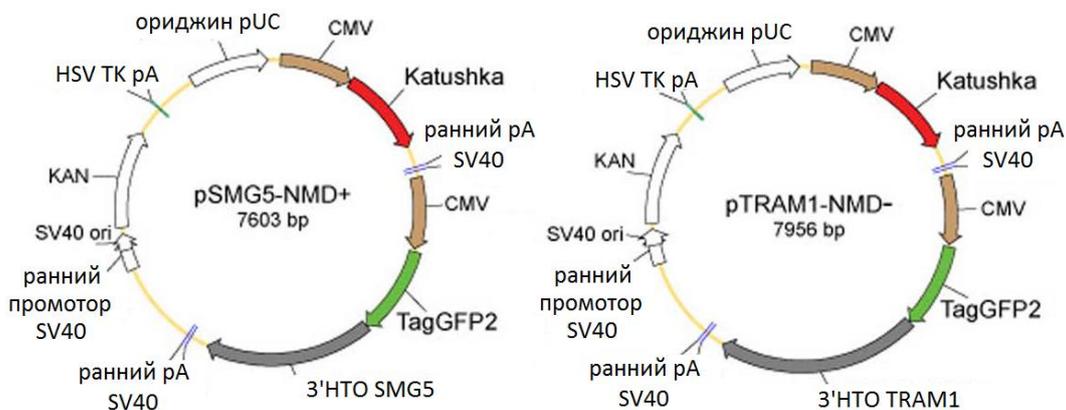


Рис. 6 Схематичное изображение репортерных конструкций pSMG5-NMD+ и pTRAM1-NMD-. Приведены основные генетические элементы репортерных конструкций pSMG5-NMD+ (слева) и pTRAM1-NMD- (справа). Обозначения см. Рис. 4, серые стрелки – полноразмерные 3'-НТО мРНК генов SMG5 и TRAM1.

Аналогично описанной выше схеме функционирования репортеров pNMD+ и pNMD-, клетки, трансфицированные pSMG5-NMD+ и pTRAM1-NMD-, обладают зеленой и красной флуоресценцией. 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 плазмиде pSMG5-NMD+ кДНК зеленого флуоресцентного белка фланкирован с 3'-конца последовательностью ДНК, содержащей полноразмерную 3'-НТО SMG5. 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 плаزمиде, как и в конструкциях pNMD+ и pNMD-, используют вторую открытую рамку считывания (ОРС) дальне-красного флуоресцентного белка Katushka.

3. NMD в культуре клеток

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 β-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 НЕК293Т. Трансфицированные контрольными плазмидами клетки обладают яркой флуоресценцией как в красном, так и в зеленом каналах (Рис.7). 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.

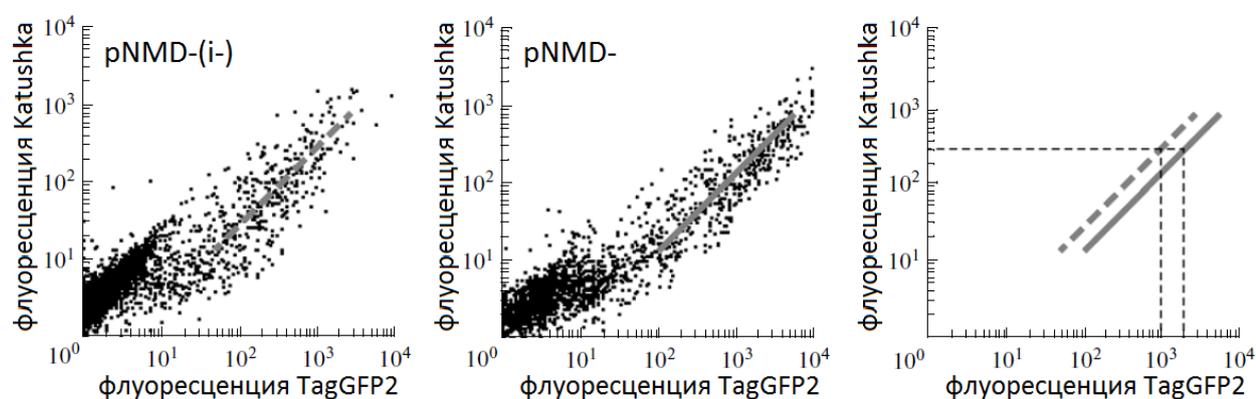


Рис. 7. Результаты проточной цитофлуориметрии клеток, временно трансфицированных векторами pNMD-(i-) (слева) или pNMD- (в центре). Результаты приведены в виде графиков в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом (флуоресценция TagGFP2) и красном (флуоресценция Katushka) каналах. Для 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-.

3.2 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. Анализ методом проточной цитофлуориметрии показал, что трансфицированные плазмидами pNMD- или pNMD+ клетки группируются в области, формирующей диагональ в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом и красном каналах (Рис. 8). 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+ (Рис. 9). Также необходимо отметить, что в эксперименте измеряемая активность NMD не зависела

от уровня экспрессии транскриптов репортера (Рис. 8). 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.

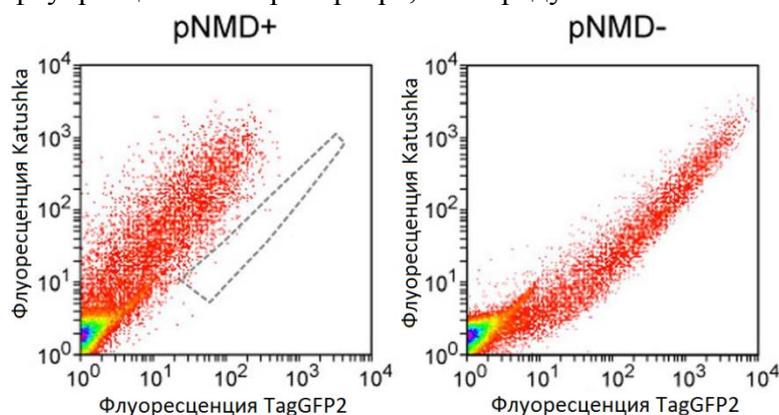


Рис. 8. Анализ клеток HEK293T, транзистентно трансфицированных репортерными конструкциями pNMD+ (слева) и pNMD- (справа), методом проточной цитофлуориметрии. Результаты приведены в виде графиков в координатах логарифмов интенсивности флуоресценции в зеленом (флуоресценция TagGFP2) и красном (флуоресценция Katushka) каналах. Для наглядности сравнения область, в которой группируются клетки, трансфицированные контрольной конструкцией pNMD-, выделена пунктиром.

транскриптов, кодирующих TagGFP2, в клетках HEK293T. Это указывает, функционирование репортерных конструкций на уровне мРНК соответствует разработанной схеме для анализа.

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-. 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 по сравнению с клетками, контрольной репортерной конструкцией pNMD-. Таким образом, объединение двух кассет экспрессии в одной репортерной плазмиде имеет преимущество по сравнению с ко-трансфекцией.

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. В результате мы наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции в зеленом канале для клеток, трансфицированных рNMD+, что соответствовало ожидаемому ингибированию активности NMD (Рис. 9), в то время как отношения интенсивностей флуоресцентных сигналов для клеток, трансфицированных рNMD-, изменилось незначительно (<30%). Далее мы использовали специфичное ингибирование NMD за счет нокаута UPF1.

Мы использовали известный эффект специфического подавления активности NMD под действием РНК-интерференции. Был сконструирован вектор pshUPF1, кодирующий кшРНК против hUPF1. 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. 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 рNMD+ и рNMD- 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 рNMD+, в то время для клеток, трансфицированных плазмидой рNMD-, отношение сигналов было практически неизменным (Рис.9). Отрицательный контроль без специфической кшРНК (конструкция shControl) практически не влияла на флуоресценцию репортера.

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 рNMD- или рNMD+, 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 (Рис.9). 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. Данный анализ показал хорошее соответствие между активностью NMD, измеренной по флуоресценции репортера и с помощью количественной ПЦР, для всех исследованных образцов (Рис.9). Кроме того, с помощью количественной ПЦР оценивали ингибиторный эффект ингибитора синтеза белка циклогексимида (CHX). Как известно из данных литературы, CHX является мощным ингибитором NMD, так как для запуска распада мРНК под действием NMD необходима трансляция мРНК-мишени. В обработанных CHX клетках, трансфицированных конструкцией pNMD+, 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) (Рис.9).

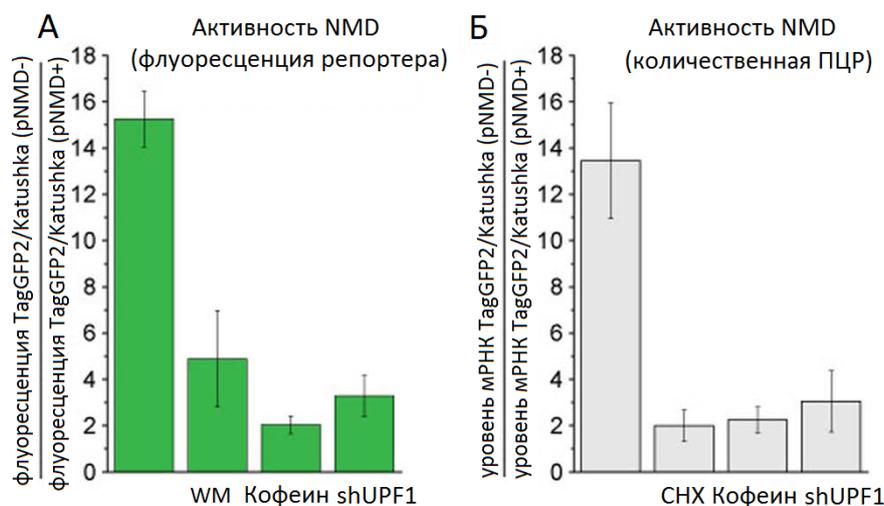


Рис. 9. Оценка способности разработанного репортера зависимого от сплайсинга NMD отслеживать изменения активности NMD в клетках HEK293T. **А.** Активность NMD определяли по флуоресцентному сигналу репортера в клетках HEK293T, транзientно трансфицированных плазмидами pNMD+ и pNMD-. **Б.** Активность NMD 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. Значения активности NMD в различных условиях были по существу одинаковыми при измерении флуоресцентных сигналов и при измерении методом количественной ПЦР. Приведены усредненные данные для 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением.

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 (Рис.10). 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.

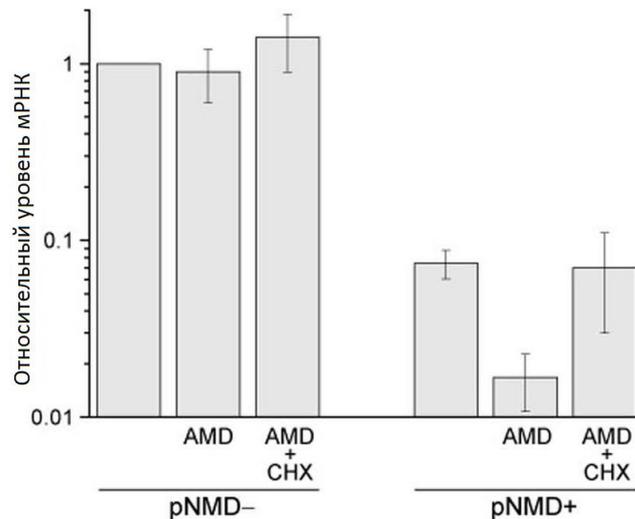


Рис. 10. Оценка стабильности мРНК, кодирующей TagGFP2, для репортерных конструкций pNMD+ и pNMD- в клетках HEK293T. Уровень мРНК TagGFP2 измеряли с помощью количественной ПЦР. Клетки не подвергали обработке или обрабатывали актиномицином D или актиномицином D совместно с ингибитором NMD циклогексимином (CHX). Уровень мРНК TagGFP2 сначала нормировали на уровень мРНК Katushka, 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.

3.4 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 (Рис.11). В линии клеток HeLa Kyoto снижение уровня транскрипта-мишени NMD составило $14,4 \pm 1,3$ раз, что сходно с активностью NMD в клетках HEK293T. Исследованные первичные культуры клеток, 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.

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 (Рис.11) 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. Другим потенциальным объяснением является повышение уровня кальция при контактном ингибировании роста клеток. Было показано, что зависящая от плотности клеток остановка роста клеток опосредована

сигналлингом через интегрины и повышением уровня кальция в клетках. 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.

Указанную гетерогенность было невозможно обнаружить с использованием классических методов измерения активности NMD или с помощью известного люминесцентного или флуоресцентного репортера на основе GFP.

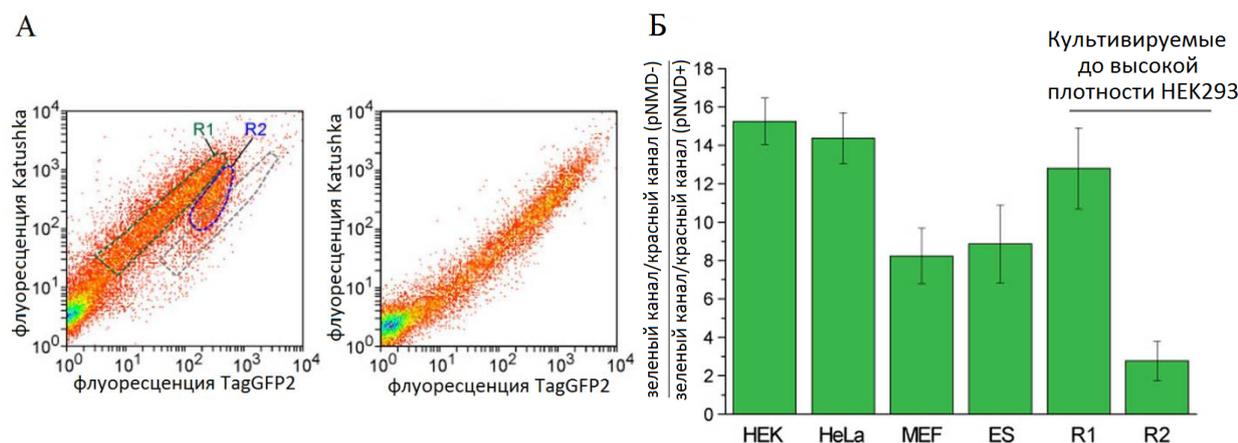


Рис. 11. Измерения активности NMD с помощью зависимого от сплайсинга репортера в различных клеточных линиях. А. Культивируемые до высокой плотности клетки HEK293T. Заметна четкая гетерогенность активности NMD в этих клетках. Зеленая и синяя пунктирные линии показывают популяции R1 и R2 с различными активностями NMD. Б. Активность NMD, измеренная по флуоресценции репортера в указанных клеточных линиях. Приведены усредненные данные для 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением.

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+ или pTRAM1-NMD- и анализировали методом проточной цитофлуориметрии (Рис. 12), 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-, 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+, соответственно (Рис.12). 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+ (Рис.12). Ко-трансфекция репортерными плазмидами с pshUPF1 привела к сильному уменьшению различий во флуоресценции между клетками, трансфицированными pSMG5-NMD+ и pTRAM1-NMD- ($2,5 \pm 0,2$ раза; Рис. 12), что соответствовало падению активности NMD. Контрольная кшРНК не изменяла флуоресценцию репортера. Анализ клеток HEK293T, трансфицированных репортерными конструкциями pSMG5-NMD+ и pTRAM1-NMD-, методом количественной ОТ-ПЦР показал увеличение уровня транскрипта, кодирующего TagGFP2, в $4,7 \pm 0,8$ раз в контрольном

образце pTRAM1-NMD- по сравнению pSMG5-NMD+, 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+ (Рис. 12).

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 зависящего от сплайсинга NMD (Рисунки 11 и 12 для сравнения с репортером pNMD+/-).

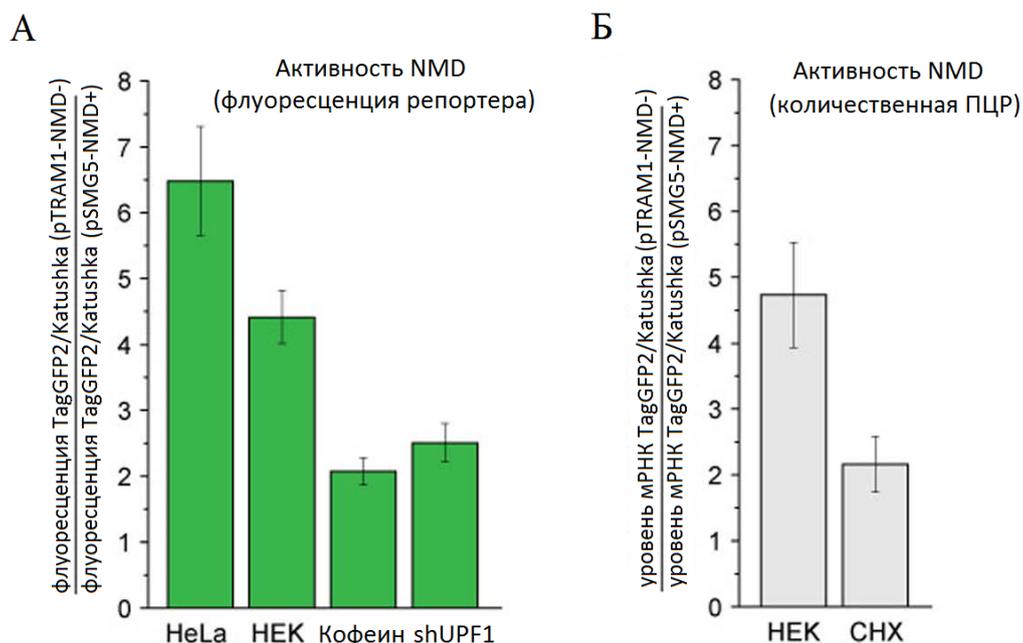


Рис. 12. Измерение активности независимого от сплайсинга NMD в клетках с помощью разработанного репортера. Активность NMD клетках HeLa или HEK293T, обработанных или не обработанных кофеином, кшРНК против UPF1 (shUPF1) или циклогексимидом (CHX). Данные получены с помощью анализа флуоресценции репортера (А) или количественной ПЦР (Б). Приведены усредненные данные для 5 независимых экспериментов со стандартным отклонением.

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 (Рис.13). 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+. 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). 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. 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.

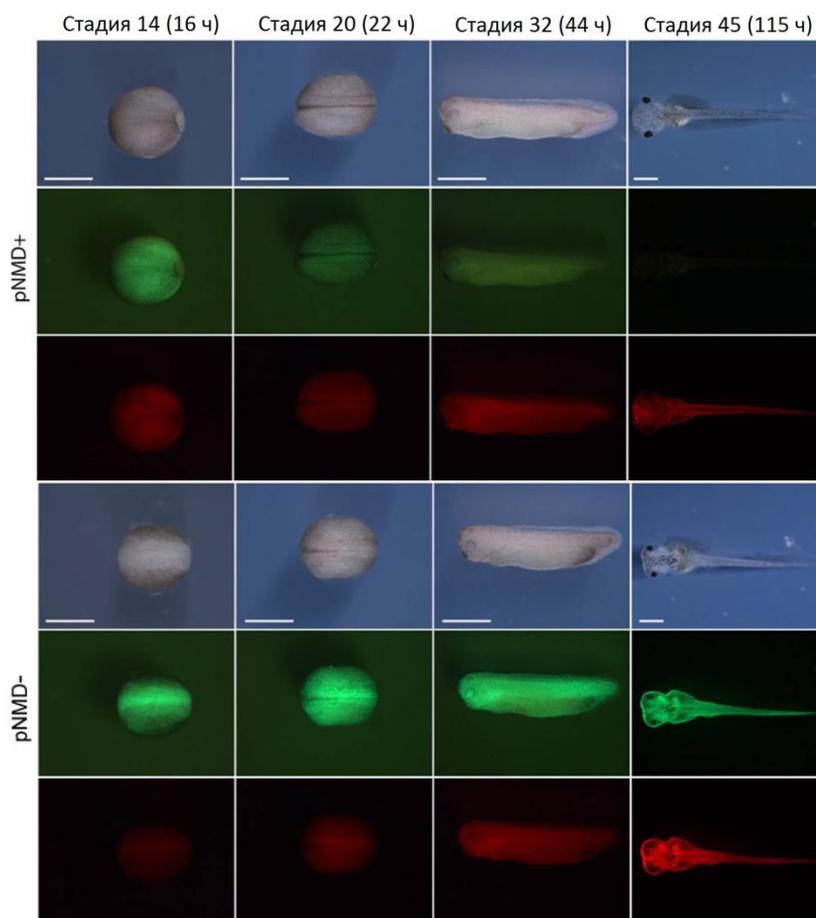


Рис. 13. Измерение активности зависимо от сплайсинга NMD с помощью разработанного репортера в эмбрионах *Xenopus*. Флуоресцентные микрофотографии трансгенных эмбрионов, экспрессирующих pNMD+ (верхние изображения) или pNMD- (серия изображений ниже). Эмбрионы фотографировали в режиме световой микроскопии (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.

5. Применение интрона 2 гена β -глобина человека для усиления экспрессии химерных генов

Ранее при тестировании контрольных репортерных конструкций pNMD- и pNMD-(i-) мы обнаружили, что присутствие сплайсируемого интрона в 3'НТО транскрипта, кодирующего TagGFP2, в конструкции pNMD- приводило к почти двукратному увеличению экспрессии TagGFP2 по сравнению с безинтронной конструкцией pNMD-(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. Эти эффекты могут привести к разному уровню экспрессии содержащих интроны и безинтронных вариантов генетических конструкций.

Для увеличения гетерологичной экспрессии генетических конструкций в настоящее время предложено включать интроны в 5'-нетранслируемую область химерных генов, а также непосредственно в кодирующую последовательность гена.

Механизм опосредованного интронами усиления экспрессии до сих пор не ясен. 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. Из литературных данных также известно, что интрон 2 гена β -глобина необходим для его экспрессии в гетерологичных условиях. Однако в литературе, напротив, описано либо явление ослабления экспрессии генетических конструкций при введении различных сплайсируемых интронов в 3'-нетранслируемую область химерных генов, либо отсутствие эффекта усиления экспрессии.

Описан процесс активации критических акцепторных сайтов сплайсинга внутри кодирующей последовательности химерного гена под действием интрона в 5'-нетранслируемой области, приводящий к сбою рамки считывания. 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). Фрагмент гена β -глобина, несущий интрон 2, клонировали в вектор после кодирующей последовательности белка TurboYFPdest. Анализ клеток HEK293T полученным вектором 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).

Исследования частично выполнены на оборудовании ЦКП ИБХ.

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.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

Статьи

1. **Anton P. Pereverzev**, Nadya G. Gurskaya, Galina V. Ermakova, Elena I. Kudryavtseva, Nadezhda M. Markina, Alexey A. Kotlobay, Sergey A. Lukyanov, Andrey G. Zaisky, Konstantin A. Lukyanov. Method for quantitative analysis of nonsense-mediated mRNA decay at the single cell level. *Sci. Rep.* 2015; 5: 7729.
2. Nadya G. Gurskaya, Dmitry B. Staroverov, Lijuan Zhang, Arkady F. Fradkov, Nadezhda M. Markina, **Anton P. Pereverzev**, Konstantin A. Lukyanov. Analysis of alternative splicing of cassette exons at single-cell level using two fluorescent proteins. *Nucleic Acids Res.* 2012 Apr; 40(8): e57.
3. **А. П. Переверзев**, Н. М. Маркина, Ю. Г. Янушевич, Т. В. Городничева, Б. Э. Минасян, К. А. Лукьянов, Н. Г. Гурская. Усиление экспрессии химерных генов включением в их 3'-нетранслируемую область интрона 2 гена бета-глобина человека. *Биоорганическая химия*, 2014, том 40, № 3, с. 293–296.

Тезисы

1. **А.П. Переверзев**, Н.Г. Гурцкая, Н.М. Маркина, К.А. Лукьянов. Метод анализа нонсенс-зависимой деградации мРНК с помощью флуоресцентных белков. Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. академиков Ю.А.Овчинникова и М.М.Шемякина РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А.Овчинникова (Москва, 15-19 сентября 2014 г). *Acta Naturae*, 2014, спецвыпуск №1, с.42.