



УДК 577.21

## УСИЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ХИМЕРНЫХ ГЕНОВ ВКЛЮЧЕНИЕМ В ИХ 3'-НЕТРАНСЛИРУЕМУЮ ОБЛАСТЬ ИНТРОНА 2 ГЕНА БЕТА-ГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

© 2014 г. А. П. Переверзев\*, Н. М. Маркина\*, \*\*, Ю. Г. Янушевич\*\*, Т. В. Городничева\*\*,  
Б. Э. Минасян\*\*, К. А. Лукьянов\*, Н. Г. Гурская\*, #

\*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*ЗАО Евrogen

117997 ГСП, Москва, В437, ул. МиклухоМаклая, 16/10

Поступила в редакцию 04.10.2013 г.

Принята к печати 25.11.2013 г.

Исследована возможность увеличения гетерологичной экспрессии в клетках млекопитающих при включении интронов в 3'-нетранслируемую область соответствующего гена. Для этого в экспрессионный вектор, содержащий ген флуоресцентного белка TagGFP2, вводили интрон 2 гена  $\beta$ -глобина человека. Данная последовательность встраивалась после стоп-кодона TagGFP2 на расстоянии 35 нт. от стоп-кодона до сайта сплайсинга. Это позволило избежать процесса нонсенс-опосредованной деградации мРНК. Использование второй рамки считывания, кодирующей красный флуоресцентный белок Katushka, позволило нормировать уровень трансфекции и экспрессии химерных конструкций. Проточная цитофлуориметрия культуры клеток НЕК293Т, временно трансфицированных генетическими конструкциями, содержащими и не содержащими интрон, позволила выявить увеличение интенсивности флуоресценции в зеленом канале для конструкции с интроном в  $1.8 \pm 0.2$  раза относительно контрольной безинтронной конструкции. Аналогичное усиление уровня экспрессии в  $1.7 \pm 0.2$  раза при наличии интрона 2  $\beta$ -глобина 3'-нетранслируемой области было показано также для гена, кодирующего дестабилизированный вариант флуоресцентного белка TurboYFP. Эффект увеличения уровня экспрессии химерных конструкций в клетках млекопитающих введением интрона в 3'-нетранслируемую область целевого гена можно использовать в различных модельных системах, где введение 5'-концевого интрона в последовательность является неприемлемым.

*Ключевые слова:* флуоресцентный белок, интрон,  $\beta$ -глобин человека, NMD, 3'-нетранслируемая область химерных генов, проточная цитофлуориметрия.

DOI: 10.7868/S0132342314030117

### ВВЕДЕНИЕ

Характерной чертой большинства эукариотических генов является наличие в них одного или более, иногда десятков, интронов, которые должны быть вырезаны для получения зрелых мРНК [1]. При этом установлено влияние интронов и их вырезания на многие аспекты метаболизма РНК, такие как полиаденилирование пре-мРНК, экспорт мРНК из ядра и ее распад [2]. Эти эффекты могут привести к разному уровню экспрессии содержащих интроны и безинтронных вариантов генетических конструкций [3, 4].

Для увеличения гетерологичной экспрессии генетических конструкций предложено включать интроны в 5'-нетранслируемую область химерных генов [5–7], а также непосредственно в коди-

рующую последовательность гена [8]. При этом экспрессия, как правило, усиливается в 2–10 раз [9], а в некоторых случаях может составлять и большую величину [10].

Механизм опосредованного интронами усиления экспрессии до сих пор не ясен [9]. Предложенная недавно модель, объясняющая данный феномен, предполагает, что усиление экспрессии не должно зависеть от места расположения интрона в пре-мРНК [11]. Из литературных данных известно, что интрон 2 гена  $\beta$ -глобина необходим для его экспрессии в гетерологических условиях [12]. 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 [13].

Однако в литературе, напротив, описано либо явление ослабления экспрессии генетических

Автор для связи (тел.: +7 (499) 724-81-22; эл. почта: ngurskaya@mail.ru).

конструкций при введении различных сплайсируемых интронов в 3'-нетранслируемую область химерных генов [14], либо отсутствие эффекта усиления экспрессии [9, 15].

В некоторых случаях включение интронов в 3'-нетранслируемую область химерных генов может приводить к деградации синтезированных молекул мРНК под действием нонсенс-опосредованной деградации РНК (Nonsense-Mediated Decay, NMD) [16, 17]. У млекопитающих в большинстве генов стоп-кодон расположен в последнем экзоне, и стоп-кодоны, расположенные на расстоянии >50 нт. до последнего места соединения экзонов, распознаются как преждевременные. Механизм распознавания основан на взаимодействии рибосомы с белковым комплексом EJC, связывающимся с мРНК вблизи места соединения экзонов [18]. Если стоп-кодон распознается как преждевременный, молекула мРНК расщепляется вовлеченными в процесс NMD белками. Как правило, в результате процесса NMD уменьшается количество РНК-субстрата в клетках в 5–20 раз [19, 20]. 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 криптических акцепторных сайтов сплайсинга внутри кодирующей последовательности химерного гена под действием интрона в 5'-нетранслируемой области, приводящий к сбою рамки считывания [21]. Это делает предпочтительным введение усиливающего экспрессию интрона в 3'-нетранслируемую область химерного гена.

Целью настоящей работы было исследовать возможность увеличения гетерологичной экспрессии белков при включении интронов в 3'-нетранслируемую область химерного гена. При этом мРНК химерного гена с интроном в 3'-некодирующей области конструировали устойчивой к NMD, оставляя менее 50 нт. между стоп-кодоном и донорным сайтом сплайсинга интрона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для экспериментальной проверки влияния сплайсируемого интрона в 3'-нетранслируемой области гена на уровень экспрессии кодируемого белка мы создали генно-инженерные конструкции для независимой экспрессии двух генов в клетках млекопитающих. Конструкции несли два кодирующих флуоресцентные белки гена, каждый из которых включал ранний промотор цитомегаловируса и ранний сигнал полиаденилирования вируса SV40. Первый ген кодировал дальнекрасный флуоресцентный белок *Katushka* [22]; был использован вариант этого гена, лишенный

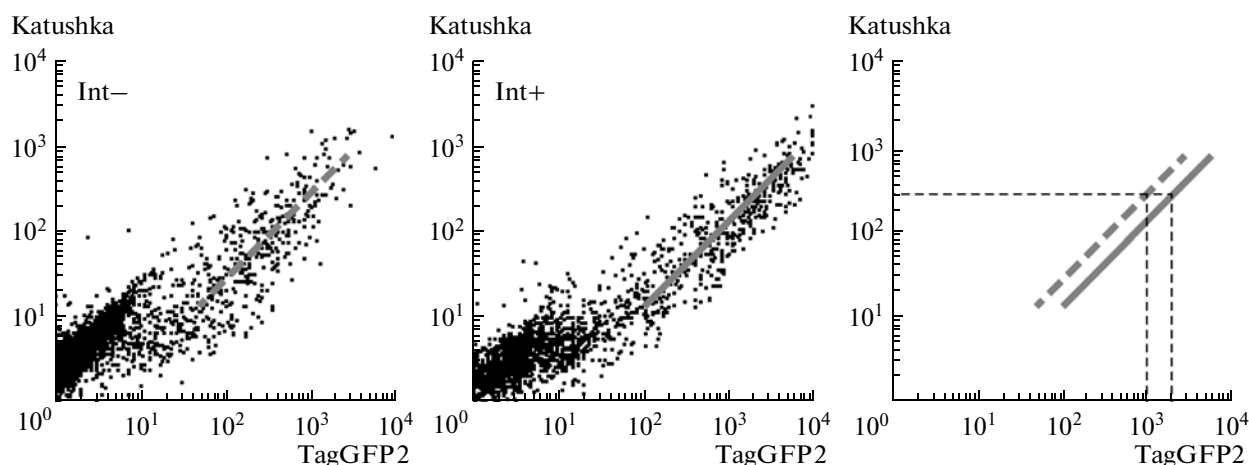
потенциальных сайтов сплайсинга [23]. Второй ген кодировал зеленый флуоресцентный белок *TagGFP2* и дополнительно содержал после стоп-кодона *TagGFP2* фрагмент гена  $\beta$ -глобина человека, несущий интрон 2 (вектор "Int+"), или соответствующую сплайсированную безинтронную последовательность мРНК  $\beta$ -глобина (вектор "Int-"). После сплайсинга последовательности обеих мРНК, кодирующих белок *TagGFP2*, были идентичны. Так как расстояние между стоп-кодоном кодирующей последовательности и местом соединения экзонов фрагмента гена  $\beta$ -глобина составляло 35 нт, мРНК Int+ была устойчива к NMD и данный процесс не влиял на экспрессию *TagGFP2*. Транскрипт, кодирующий белок *Katushka*, использовали для нормирования эффективности трансфекции и уровня экспрессии в клетках, так как белки *Katushka* и *TagGFP2* дают хорошо спектрально различимые флуоресцентные сигналы [24]. Таким образом, флуоресцентный сигнал *TagGFP2*, нормированный на интенсивность флуоресценции *Katushka*, позволял судить о влиянии присутствия интрона в 3'-нетранслируемой области Int+ на экспрессию *TagGFP2*.

Клетки, трансфицированные конструкцией с геном Int+, обладали в  $1.8 \pm 0.2$  раза более высокой нормированной флуоресценцией в зеленом канале по сравнению с клетками, трансфицированными конструкцией Int- (рисунок). Следовательно, введение интрона  $\beta$ -глобина в 3'-нетранслируемую область химерного гена усиливало его экспрессию.

Наблюдаемый эффект 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 [25].

Фрагмент гена  $\beta$ -глобина, несущий интрон 2, клонировали в вектор после кодирующей последовательности белка TurboYFP-dest. Полученными конструкциями и исходными конструкциями без интрона временно трансфицировали клетки НЕК293Т. Анализ клеток через 24 ч после трансфекции методом проточной цитофлуорометрии показал, что средняя интенсивность флуоресценции клеток, содержащих вектор с последовательностью интрона, в  $1.7 \pm 0.2$  раза выше относительно клеток, несущих исходную конструкцию TurboYFP-dest без интрона.

Мы считаем, что показанный в настоящей работе метод может быть использован для увеличения уровня экспрессии в гетерологических системах в



**Рисунок.** Результаты проточной цитофлуориметрии клеток, временно трансфицированных векторами Int- (слева) или Int+ (в центре). Каждая точка на бивариантном плоте показывает интенсивность флуоресценции клетки в зеленом (горизонтальная шкала) и красном (вертикальная шкала) каналах детекции. Для удобства сравнения клеточных популяций между собой середина “диагонали” клеток Int- показана пунктирной линией, а клеток Int+ — сплошной линией. На панели справа представлено сравнение середин “диагоналей” распределения клеточных популяций Int- и Int+.

тех случаях, когда включение интронов в 5'-нетранслируемую область гена является неприемлемым (например, в случае наличия в кодирующей части гена акцепторных сайтов сплайсинга).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Генно-инженерные манипуляции и культивирование клеток производили в соответствии со стандартными протоколами. Фрагмент ДНК, кодирующий  $\beta$ -глобин человека, амплифицировали с помощью праймеров (5'-3') GTGGTGAGGC-CCTGGGCA и ATGTTTTTATTAGGCAGAATCC на матрице геномной ДНК человека. Амплифицированный фрагмент ДНК использовали для второй амплификации со специфическими праймерами, несущими сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции HindIII и NotI, GTGAAAGCTTGTGACAAGCTG-CACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGG и TCTAGAGTCCGCGGCCGCGGCAGAATCCAGATGCTC (сайты рестрикции подчеркнуты). Фрагмент кДНК, содержащий безинтронную последовательность  $\beta$ -глобина человека, получили ПЦР с праймерами, указанными выше, на матрице образца суммарной амплифицированной кДНК из клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой Int+.

Культуру клеток человека HEK293T временно трансфицировали описанными выше конструкциями с помощью реагента FuGene 6 (Roche, США) согласно инструкции производителя. Клетки росли в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma, США) при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч после трансфекции.

Затем клетки анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Для возбуждения флуоресценции использовали лазер с длиной волны 488 нм. Флуоресценция детектировалась в зеленом (510–530 нм) и красном (660–690 нм) каналах. Для проверки пересечения областей детекции в зеленом и красном канале культуру клеток HEK293T, временно трансфицированную контрольными векторами, содержащими гены флуоресцентных белков Katushka или TagGFP2 (Evrogen), анализировали на цитофлуориметре. Параметры детекции были подобраны таким образом, что флуоресценция клеток с TagGFP2 определялась лишь в зеленом канале, а клеток с Katushka — только в красном канале.

Данные цитофлуориметра были экспортированы с помощью программы Weasel и обработаны в программе Microsoft Excel. Для каждой клетки было вычислено отношение интенсивностей флуоресценции в зеленом и красном каналах, затем определяли среднее значение для всей популяции трансфицированных клеток. Для количественной характеристики влияния интрона сравнивали средние значения отношений интенсивностей флуоресценции, полученные для конструкции, содержащей и не содержащей интрон.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантами РФФИ № 12-04-00994а, программой поддержки ведущих научных школ НШ-1674.2012.4, и Министерством образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.740.11.0748).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kelemen O., Convertini P., Zhang Z., Wen Y., Shen M., Falaleeva M., Stamm S. // *Gene*. 2013. V. 514. P. 1–30.
2. Le Hir H., Nott A., Moore M.J. // *Trends Biochem. Sci.* 2003. V. 28. P. 215–220.
3. Li H.W., Gao Y.X., Raizada M.K., Summers C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 336. P. 29–35.
4. Choi T., Huang M., Gorman C., Jaenisch R. // *Mol. Cell Biol.* 1991. V. 11. P. 3070–3074.
5. Morello L., Giani S., Troina F., Breviario D. // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 533–544.
6. Quilici L.S., Silva-Pereira I., Andrade A.C., Albuquerque F.C., Brigido M.M., Maranhão A.Q. // *Biotechnol. Lett.* 2013. V. 35. P. 21–27.
7. Schambach A., Wodrich H., Hildinger M., Bohne J., Kräusslich H.G., Baum C. // *Mol. Ther.* 2000. V. 2. P. 435–445.
8. Lacy-Hulbert A., Thomas R., Li X.P., Lilley C.E., Coffin R.S., Roes J. // *Gene Ther.* 2001. V. 8. P. 649–653.
9. Rose A.B. // *RNA*. 2002. V.8. P. 1444–1453.
10. Buchman A.R., Berg P. // *Mol. Cell Biol.* 1988. V. 8. P. 4395–4405.
11. Moabbi A.M., Agarwal N., Kaderi El.B., Ansari A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. V. 109. P. 8505–8510.
12. Jackson Ch.E., O'Neil D., Bank A. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 28448–28456.
13. Bharadwaj R.R., Trainor C.D., Pasceri P.P., Ellis J. // *Blood*. 2003. V. 101. P. 1603–1610.
14. Evans M.J., Scarpulla R.C. // *Gene*. 1989. V. 84. P. 135–142.
15. Palmiter R.D., Sandgren E.P., Avarbock M.R., Allen D.D., Brinster R.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991. V. 88. P. 478–482.
16. Kervestin S., Jacobson A. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. V. 13. P. 700–712.
17. Schweingruber C., Rufener S.C., Zünd D., Yamashita A., Mühlemann O. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1829. P. 612–623.
18. Shyu A.B., Wilkinson M.F., van Hoof A. // *EMBO J.* 2008. V. 27. P. 471–481.
19. Gudikote J.P., Imam J.S., Garcia R.F., Wilkinson M.F. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. V. 12. P. 801–809.
20. Usuki F., Yamashita A., Higuchi I., Ohnishi T., Shiraishi T., Osame M., Ohno S. // *Ann. Neurol.* 2004. V. 55. P. 740–744.
21. Dongmei C., MacArthur P.S., Rong S., Parks J.S., Shelness G.S. // *J. Lipid Res.* 2010. V. 51. P. 849–855.
22. Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Lukyanov K.A., Bogdanova E.A., Zaratisky A.G., Lukyanov S., Chudakov D.M. // *Nat. Methods*. 2007. V. 4. P. 741–746.
23. Gurskaia N.G., Staroverov D.B., Fradkov A.F., Luk'ianov K.A. // *Bioorg. Khim.* 2011. V. 37. P. 425–428 [Гурская Н.Г., Староверов Д.Б., Фрадков А.Ф., Лукьянов К.А. // *Биоорг. химия*. 2011. М. 37. P.425–428].
24. Gurskaya N.G., Staroverov D.B., Zhang L., Fradkov A.F., Markina N.M., Pereverzev A.P., Lukyanov K.A. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. e57.
25. Li X., Zhao X., Fang Y., Jiang X., Duong T., Fan C., Huang C.C., Kain S.R. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 34970–34975.

## Intron 2 of Human Beta-Globin in 3'-untranslated Region Enhances Expression of Chimeric Genes

A. P. Pereverzev\*, N. M. Markina\*, \*\*, Y. G. Yanushevich\*\*, T. V. Gorodnicheva\*\*, B. E. Minasyan\*\*, K. A. Lukyanov\*, N. G. Gurskaya\*

\*Phone: +7 (499) 724-81-22; e-mail: ngurskaya@mail.ru

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\* Evrogen JSC, Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Possibility to enhance heterologous gene expression in mammalian cells by introduction of an intron in 3' untranslated region (UTR) was investigated. To this end, a fragment of human beta-globin gene with intron 2 and flanked exon regions was introduced into vector encoding green fluorescent protein TagGFP2 after the TagGFP2 stop-codon (Int+). The distance between the stop-codon and the exon junction was 35 nucleotides. It ensured that Int+ mRNA was resistant to degradation by nonsense mediated decay (NMD) machinery. A control vector Int- contained corresponding intronless sequence of the beta-globin mRNA. On the same plasmid, the second gene encoded far-red fluorescent protein Katushka was used to normalize fluorescence for transfection efficiency and expression level in individual cells. Transiently transfected HEK293T cells were analysed by flow cytometry. It was shown that cells transfected with plasmid carrying the Int+ gene possess  $1.8 \pm 0.2$  fold higher green fluorescence compared to Int- cells. The observed effect was used to enhance expression of destabilized variants of yellow fluorescent protein TurboYFP-dest with high degradation rate in mammalian cells. We believe that introduction of beta-globin intron in the 3'-UTR of the chimeric gene can be used to enhance its expression and may be advantageous in some cases when usage of 5'-UTR intron is inappropriate.

**Keywords:** fluorescent protein, intron, human beta-globin, NMD, 3'-UTR of the chimeric gene, transiently transfected