

Пропуск экзонов и терапия мышечной дистрофии Дюшенна: Выбор наиболее эффективной последовательности U1 антисмысловой мРНК, вызывающей пропуск экзона 51 в гене дистрофина

Tania Incitti¹, Fernanda G De Angelis¹, Valentina Cazzella¹, Olga Sthandier¹, Chiara Pinnarò¹, Ivano Legnini¹ and Irene Bozzoni^{1,2}

¹Кафедра генетики и молекулярной биологии, Fondazione Cenci-Bolognetti, Рим, Италия; ²IBPM of CNR, Sapienza University of Rome, Рим, Италия

Одним из перспективных подходов к генетической терапии мышечной дистрофии Дюшенна (МДД) является индукция пропуска экзонов. Рассматривая возможные подходы к лечению пациентов, крайне важно выделить наиболее значимые антисмысловые последовательности, использование которых позволит обеспечить наиболее эффективный пропуск. В этой статье мы сравнивали эффективность индукции пропуска 51 экзона 10 различных антисмысловых молекул, которые блокируют границы сплайсинга и/или подавляют экзонные энхансеры сплайсинга (ЭЭС), являющиеся частью U1 малой ядерной РНК (мяРНК). Эффективность каждой последовательности оценивалась на культуре миобластов лиц, страдающих МДД, для которых характерна делеция экзонов 48-50, нарушение можно устранить пропуском экзона 51. По нашим данным, наиболее высокая эффективность для индукции пропуска экзонов и восстановлению нормальной структуры дистрофина была показана у U1 мяРНК - производного, антисмысловой молекулы, обладающей сродством к границе сплайсинга экзона 51 в комбинации с внутренней последовательностью экзонов. В дальнейшем эффективность этой молекулы была показана при оценке делеции экзона 45-50, на культуре миобластов, полученных при помощи направленной дифференцировки фибробластов пациента. На этой системе мы показали, что выбранная антисмысловая последовательность вызывала пропуск экзона 51 с 50% вероятностью.

Получена 5 марта 2010; принята 19 мая 2010; электронная публикация 15 июня 2010. doi:10.1038/mt.2010.123

ВВЕДЕНИЕ

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) является одним из наиболее тяжёлых нервно-мышечных заболеваний, оно встречается у 1:3,500 новорожденных мальчиков. МДД является моногенным заболеванием, которое вызывается мутациями наиболее крупного гена высших эукариотов, кодирующего белок - дистрофин (МДД).^{1,2} Около 98% 2.4-Мб гена МДД составляют последовательности интронов, в то время, как остальную часть составляют 79 экзонов и семь различных промоторов, регулирующих синтез изоформ белка, специфичных для различных тканей. Дополнительными механизмами образования изоформ являются сплайсинг и полиаденилирование.³

В скелетных мышцах дистрофин расположен на внутренней поверхности сарколеммы, цитоплазматической мембраны миоцитов, его N-концевой домен связывается с актином цитоскелета, а C-концевой домен с комплексом белков, расположенных в сарколемме, с образованием дистрофин-ассоциированного комплекса. Эти связи

участвуют в передаче силы мышечного сокращения и являются важным компонентом, сохраняющим структуру мышечных волокон.⁴ Недавно было установлено участие дистрофина в других важных механизмах физиологии мышечных волокон, таких, как обмен кальция,⁵ и эпигенетический контроль экспрессии генов (см. 6; Cacchiarelli D, Martone J, Girardi E, Cesana M, Incitti T, Morlando M с соавт., в работе), что объясняет развитие грубых патологических изменений мышечной ткани у пациентов, страдающих мышечной дистрофией Дюшенна, у которых отсутствует дистрофин.

Поскольку генетические изменения были хорошо изучены, многие исследования направлены на изучение возможных терапевтических подходов к лечению МДД.^{7,9} За рядом исключений, все мутации, которые приводят к развитию МДД (делеции и дупликации) приводят к сдвигу рамки считывания, что приводит к образованию кодона, вызывающего нарушение трансляции дистрофина.¹⁰ Если мутации не нарушают структуру рамки считывания, как в случае мышечной дистрофии Беккера, сохраняется трансляция гена с синтезом белков, частично сохраняющих

функциональные свойства. Примечательно, что у пациентов, страдающих мышечной дистрофией Беккера, делеции около половины гена МДД сопровождаются развитием очень незначительных нарушений.^{11,12} Эти наблюдения легли в основу разработки нового терапевтического подхода, основанного на возможности управления сплайсингом мРНК предшественника дистрофина, для того, чтобы вызвать пропуск экзонов и восстановить рамку считывания. Подобный эффект можно получить при использовании антисмысловых молекул, которые присоединяются к границам сплайсинга или экзонным энхансерам сплайсинга (ЭЭС), что нарушает распознавание экзона при сплайсинге.

Разными исследовательскими группами были разработаны химически-модифицированные антисмысловые олигонуклеотиды (АОН) направленные против границ сплайсинга или ЭЭС, и установлена эффективность этого подхода для восстановления синтеза дистрофина как *in vitro*¹³, так и *in vivo*.^{14,16} Безопасность и эффективность внутримышечного введения АОН была изучена в клинических исследованиях Фазы I, недавно начаты исследования системного введения препаратов.^{17,18}

Также были использованы малые ядерные РНК (мяРНК) в качестве векторов для стабильных антисмысловых последовательностей, для того, чтобы преодолеть основное ограничение подхода, основанного на использовании АОН — невысокую стабильность олигонуклеотидов, что создаёт необходимость повторного введения препаратов. Антисмысловые молекулы, полученные на основе U1 и U7 мяРНК были эффективны для индукции пропуска экзонов и сохранения структуры дистрофина, как в МДД миобластах человека¹⁹⁻²¹, так и у мышей линии mdx.²²⁻²⁴ Также был получен стойкий эффект терапии, направленной на пропуск экзонов, распространяющийся на все ткани тела, при использовании векторов с использованием адено-ассоциированных вирусов (AAV) вырабатывающих в организме мышей линии mdx антисмысловые молекулы, производные U1.²⁵

В этой статье мы оценили способность различных антисмысловых последовательностей U1 мяРНК вызывать пропуск экзона 51, действуя на различные комбинации ЭЭС и границы сплайсинга. Было создано десять различных антисмысловых молекул, из них были отобраны наиболее эффективные для проведения тройного скрининга на культуре миобластов больных МДД, на миобластах, полученных при помощи направленной дифференцировки фибробластов пациентов, страдающих МДД, и оценки с использованием люциферазной репортерной конструкции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработка и изучение действия антисмысловых молекул, направленных против экзона 51 гена МДД.

В качестве переносчика различных антисмысловых молекул для экзона 51 была использована U1 мяРНК.

Нуклеотиды из положения 3-10 5'-концевом участке U1 мяРНК, которые требуются для распознавания границы 5' сплайсинга, были заменены на бессмысловые последовательности, комплементарные различным участкам экзона 51 и его границам сплайсинга (Рисунок 1a). Поскольку ранее мы наблюдали, что обе границы сплайсинга могут быть мишенями для индукции эффективного пропуска экзонов,¹⁹ первые созданные молекулы содержали бессмысловые последовательности против обеих границ сплайсинга (5'3' и 5'3' L структуры; Рисунок 1b). Более того, поскольку было показано, что ЭЭС представляют собой мишень для эффективного пропуска экзонов,^{26,27} мы создали также химерные конструкции, содержащие бессмысловые последовательности против предполагаемых участков ЭЭС,²⁸ как по отдельности, так и в совокупности с границами сплайсинга (Рисунок 1b).

Мощные Π -зависимые U1 мяРНК последовательности гена промотера и участков, вызывающих терминацию, были использованы для создания антисмысловых последовательностей кассет экспрессии, которые были клонированы в dU3 порции 3' длинноконцевого участка повторяющихся последовательностей pRRLSIN.cPPT.PGK/GFP. WPRE лентивирусного вектора²⁹ (Рисунок 2a). Поскольку различные конструкции значительно превышают длину U1 мяРНК (в отдельных случаях до 58 нуклеотидов), мы первоначально оценили их действие и стабильность в экспериментах с использованием клеток линии HeLa. Относительная активность экспрессии оценивалась при одновременном введении плазмид U16-RBE³⁰ и нормализации эндогенной U2 мяРНК. Анализ с использованием нозерн-блоттинга показал, что все химерические молекулы накапливались в крайне сходных концентрациях (Рисунок 2b). Более того, при проведении иммунопреципитации экстрактов ядер с антителами U1-70K с последующей обработкой обратными транскриптазами (RT)-PCR (Рисунок 2c) было показано сохранение способности U1-химерических мяРНК к образованию мяРНК (комплексов белков и мяРНК - рибонуклеопротеинов).³¹

Исследование действия, направленного на пропуск экзонов в миобластах, полученных от пациентов, страдающих МДД

Для каждой последовательности в культуре 293T клеток были созданы лентивирусные частицы, которые вводились в миобласты с делецией экзонов 48-50, полученные от пациентов, страдающих МДД (Δ 48-50) (предоставлены Telethon Neuromuscular Biobank). В этом случае, индукция пропуска экзона 51 позволила сохранить нормальное строение рамки считывания и обеспечить выработку белка-дистрофина, который был на 210 аминокислот короче дикого типа. Δ 48-50 клетки инфицировались сравнимыми количествами различных рекомбинантных лентивирусов. После инфицирования проводилась стимуляция дифференцировки клеток, через 7 дней проводился забор образцов для проведения анализа РНК и белков. Пропуск экзона 51 оценивался "вложенной" ОТ-ПЦР с использованием 200 нг РНК (Рисунок 3a), в то время как вестерн-блоттинг проводился 50 мкг нефракционированного белка (Рисунок 3b). Концентрации дистрофина, установленные с использованием трёх различных

методов, по сравнению с концентрациями тубулина, нормализовались; относительные величины приводятся на гистограммах (Рисунок 3b). За исключением 5'ESE B и ESE A+B

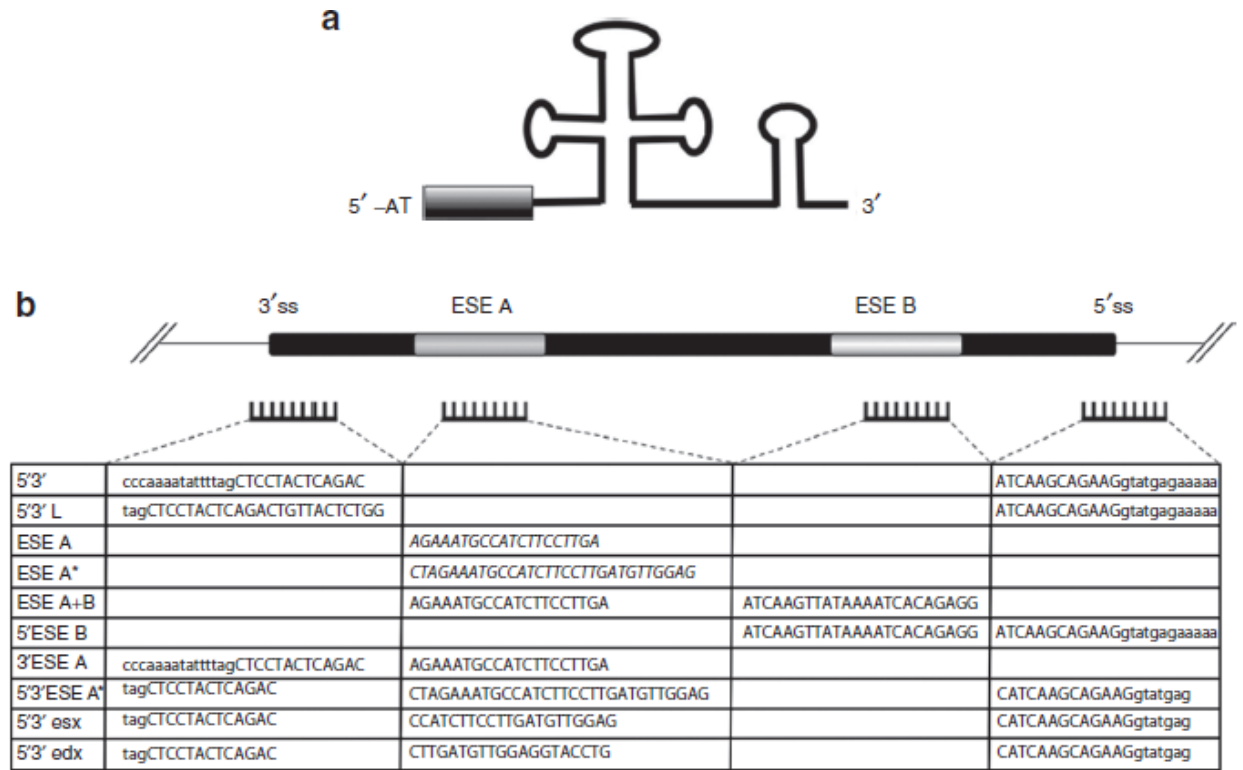


Рисунок 1 Создание и клонирование U1 антисмысловых молекул РНК. (а) Схематическое представление химерической U1 антисмысловой мРНК. Антисмысловые последовательности обозначаются серыми участками. (b) В таблице приводятся данные о 10 различных конструкциях, которые были созданы в соответствии с целевыми областями экзона 51, и примыкающих к ним последовательностях интронов (заглавными буквами – области экзона; строчными – области интронов). Структуры ESE A и ESE A* содержат последовательности (выделено курсивом), которые оцениваются в настоящее время в клинических исследованиях, проводимых компаниями Prosensa¹⁷ и AVI Biopharma¹⁸, соответственно.

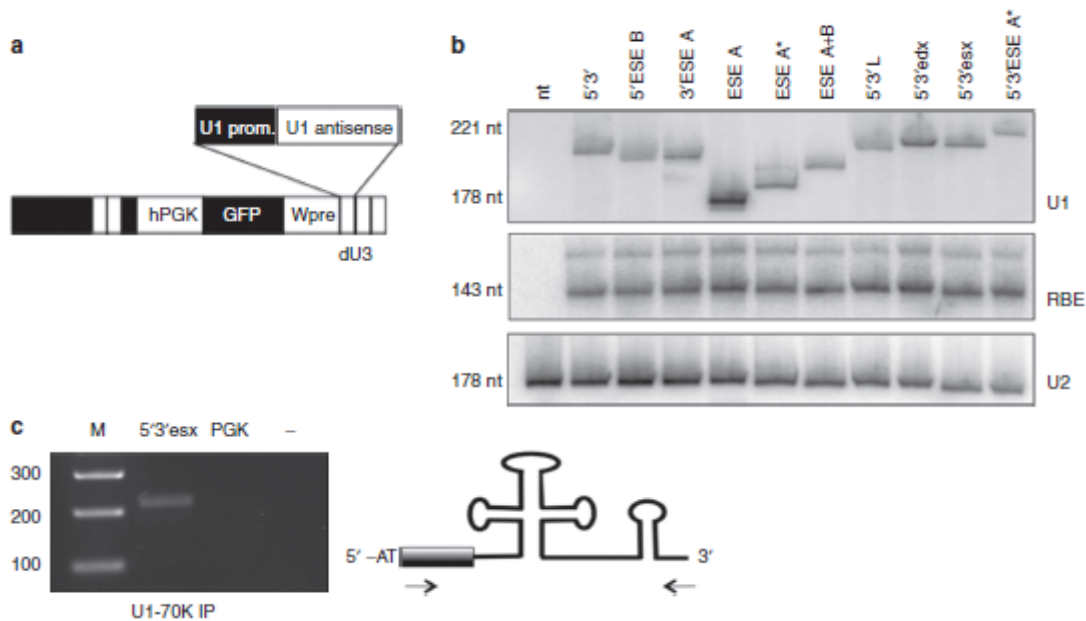


Рисунок 2 U1-антисмысловая последовательность в клетках HeLa. (а) Схематическое представление pRRL/U1-антисмысловых последовательностей. U1-антисмысловые последовательности были клонированы в dU3 области длинных концевых повторов pRRLSIN.cPPTPGK/GFP.WPRE лентивирусного остова. (b) В HeLa клетки при помощи плазмид U16-RBE были введены различные антисмысловые последовательности (экспрессирующие модифицированные U16 малые

ядрышковые РНК длиной 143 нт). Был выполнен анализ методом нозерн-блоттинга с использованием проб на определение: U1 мяРНК (панель U1), U16-RBE (панель RBE), и U2мяРНК (панель U2). Две последние гибридизации были использованы для того, чтобы нормализовать эффективность трансфекции, и в качестве контроля, соответственно. Была проведена фильтрация, чтобы исключить гибридизацию эндогенной U1 мяРНК. С другой стороны были отмечены размеры молекул. (с) Для приготовления экстрактов ядер использовались образцы 5'3'esx из эксперимента в а и иммунопреципитат антител U1-70K. РНК, выделенная из осадка в триллионных долях, оценивалась на наличие транскриптов 5'3'esx при помощи ОТ-ПЦР <полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией>, праймеры, которые использовались при выполнении этого исследования приводятся в правой панели. GFP - зелёный флуоресцентный белок кДНК; hPGK, промотор фосфоглицераткиназы человека; нт, нуклеотид.

конструкций, все образцы вызывали пропуск экзонов, наиболее эффективными были 5'3' и 5'3'esx. Примечательно, что выраженность индукции пропуска соответствовала эффективности для сохранения дистрофина (Рисунок 3б), наиболее высокая активность отмечалась у конструкций 5'3' и 5'3'esx.

Проводилось дальнейшее сравнение 5'3' и 5'3'esx последовательностей с использование метода, основанного на использовании люциферазы³², при этом синтез фермента был возможен только при пропуске экзона 51 (Рисунок 3с, верхняя панель - конструкция рLuc-ex51). Плазмиды, вызывающие выработку 5'3' and 5'3', вводились одновременно с рLuc-ex51 и с репортерной группой Ренилла. Оценки активности люциферазы (Рисунок 3с, нижняя панель) указывали, что 5'3'esx обладает большей выраженностью действия, направленного на пропуск экзона, по сравнению с 5'3', что подтверждает данные, полученные на клетках МДД. Эти результаты указывают, что участки действия ЭЭС последовательности 5'3'esx, играют важную роль в сплайсинге экзона 51, и могут повысить эффективность индукции пропуска экзонов при комбинации с антисмысловыми последовательностями, комплементарными границам сплайсинга.

Пропуск экзонов в миоблстах, полученных при помощи направленной дифференцировки фибробластов пациентов с МДД.

Для упрощения методики скрининга, которая используется для оценки активности антисмысловых последовательностей в группах пациентов, мы разработали протокол направленной дифференцировки фибробластов в миоблсты. Введение фибробластов

WT (дикого типа) с лентивирусами MyoD (Рисунок 4а) было эффективным для изменения миоблстов и мышечных трубочек, которое приводило к восстановлению синтеза дистрофина (Рисунок 4б) подтверждалось данными морфологического анализа (не приводятся). Продукция дистрофина начинается через 4 дня после **помещения в среду, вызывающую дифференцировку**, его накопление проходило параллельно с появлением у клеток свойств миоцитов (8 дней). После этого мы использовали протокол направленной дифференцировки для фибробластов пациентов, страдающих МДД, для оценки выраженности эффекта в виде индукции пропуска и последовательности 5'3'esx. Образец биоптата кожи, содержащий клетки с различными генетическими нарушениями (делеция экзонов 45-50 Δ45-50), также устранялась пропуском экзона 51, был введён лентивирус M-U1#51, носитель MyoD и кассеты экспрессии 5'3'esx (Рисунок 4а). Индукция дифференцировки происходила через 2 дня после инфекции, а на 9 и 13 день проводился забор образцов на анализы РНК и белков. На рисунке 4с показана экспрессия MyoD GFR, которые кодируются одним и тем же вектором. Рисунок 4д указывает, что экспрессия антисмысловой РНК продолжается на 9 и 13 день, что соответствует очень высокой эффективности – пропуска экзонов (почти 50%, Рисунок 4е) и восстановления синтеза дистрофина (Рисунок 4ф).

ОБСУЖДЕНИЕ

Индукция пропуска экзонов - наиболее перспективный вид генетической терапии МДД. Было выполнено два клинических исследования Фазы I,^{17,18} в которых использовались различные виды модифицированных АОН

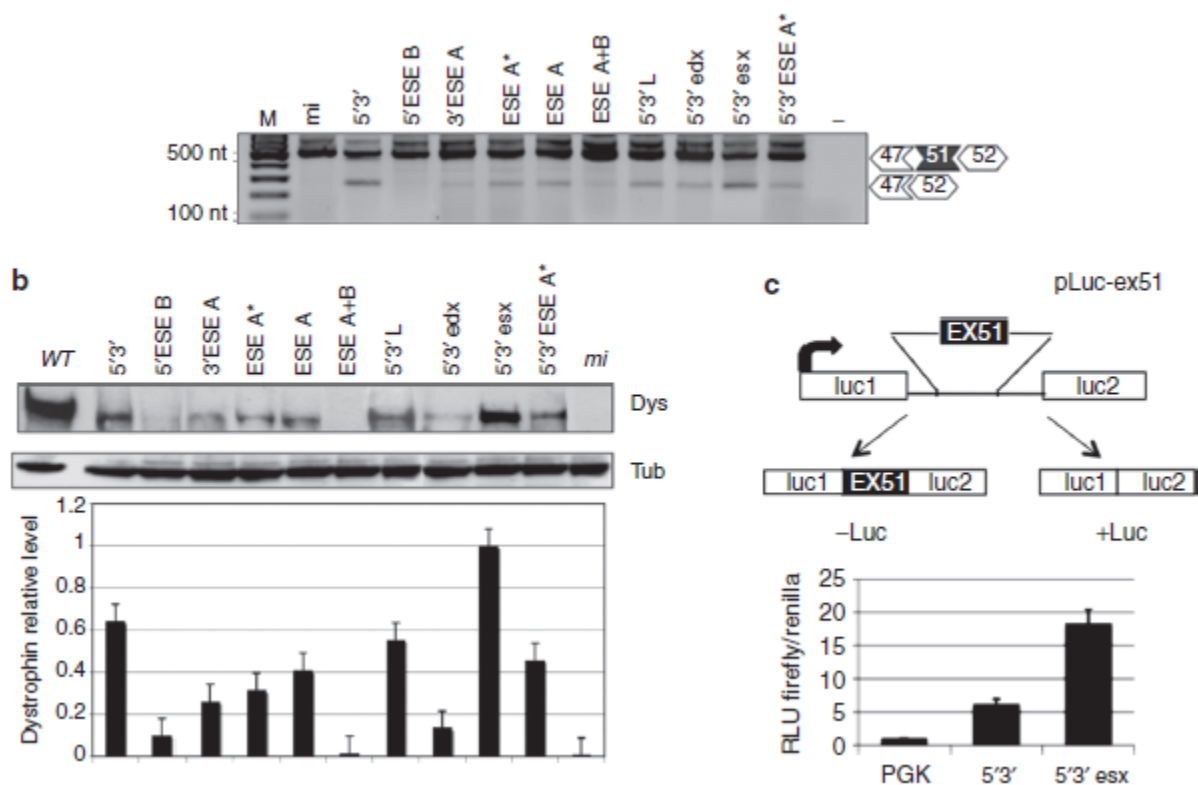


Рисунок 3 Пропуск экзона 51 и восстановление синтеза дистрофина в миоцитах Δ 48-50, полученных от больных МДД и отбор наилучших последовательностей на основании оценки сплайсинга с использованием репортерной последовательности, содержащей люциферазу. (а) Верхняя часть: схема ДНК, Δ 48-50, комплементарной дистрофину, между экзонами 46 и 54 с расположением олигонуклеотидов обратной транскриптазы-ПЦР (E46F и E54R—обратная транскриптаза), и олигонуклеотиды, использованные для "вложенной" ПЦР (E47F и E52Ro—входящие в состав «вложенной» обратной транскриптазы [«вложенная» ОТ]). Нижняя часть: "вложенная" ОТ-ПЦР на РНК, выделенной из Δ 48-50 клеток, инфицированных лентивирусами, вырабатывающими антисмысловые последовательности. Продукты синтеза, образовавшиеся после пропуска и без пропуска <экзонов>, перечисляются справа. Размеры молекул указаны слева. (б) Материал инфицированных Δ 48-50 клеток был оценен при помощи репрезентативных методов вестерн-блоттинга, с выявлением антител к анти-дистрофину (Dys) и анти-тубулину (Tub) (WT: 2 мкг или белком миоцитов скелетных мышц дикого типа; mi: 50 мкг белков в mi клетках). Гистограмма в нижней части указывает уровни дистрофина, нормализованные по уровням сигналов от тубулина. Величины были получены из трёх независимых опытов; планки погрешностей: средние \pm CO. (с) Верх: схематическое представление последовательности pLuc-ex51. Были клонированы экзон 51 и часть примыкающих к нему интронов, расположенные между экзонами люциферазы светлячка. Для того, чтобы обеспечить синтез люциферазы с участием полученной последовательности, было необходимо добиться пропуска экзона 51. Низ: гистограмма, указывающая относительные световые единицы (RLU) от C_{27} миоцитов, в которых были введены pLuc-ex51 и рТК (плазмида, обеспечивающая выработку люциферазы Ренилла), вместе с 5'-3' или 5'-3'esx последовательностями. В качестве контроля использовался неизменённый лентивирусный вектор (PGK). МДД, мышечная дистрофия Дюшенна; mi, ложно-инфицированный; -: отрицательный контроль без РНК.

полученных у пациентов при помощи внутримышечных инъекций. В обоих исследованиях анализ, выполненный через 3-4 недели после лечения, выявил высокую долю волокон, содержащих дистрофин, была показана безопасность и хорошая переносимость метода.

Параллельная стратегия использования синтетических олигонуклеотидов представлена одним из методов генетической терапии, при котором часть постоянно образующихся молекул РНК клетки является антисмысловыми последовательностями. Переносимость этого метода была показана в нескольких группах, при использовании касет экспрессии для мРНК антисмысловых молекул, выработанных в клетках мышей линии mdx под действием AAV векторов.^{22,24} В дальнейших исследованиях, на моделях мышей линии mdx было

показано, что однократное системное введение AAV1-U1 антисмысловой РНК последовательности молодым животным (в возрасте 6 недель) было эффективным для того, чтобы поддерживать положительные изменения как на молекулярном, так и на физиологическом уровне на протяжении всей жизни животного.²⁵ Эти результаты подтверждают представления о возможной эффективности одного метода для длительного лечения и лежат в основе разработки протоколов генетической терапии основанной на AAV для использования у человека.

Целью этой работы был отбор наиболее эффективных антисмысловых последовательностей РНК для индукции пропуска экзона 51 гена МДД человека. В предыдущей работе, выполненной в нашей лаборатории, было показано, что для обеспечения эффективного пропуска необходима блокада обеих границ сплайсинга при помощи антисмысловых

молекул.¹⁹ Однако, в последних исследованиях, было показано очень большое значение ЭЭС для эффективности сплайсинга²⁶ и их значимость как точек приложения стратегий с использованием антисмысловых молекул, вызывающих пропуск или включение экзона.³³ Более того, предполагается важное значение ЭЭС для пре-мРНК дистрофина, когда распознавание правильной последовательности экзона может быть нарушено большим размером интрона.³⁴ Поэтому, по аналогии с воздействием на синтетические

нуклеотиды, с целью создания и изучения набора антисмысловых молекул, направленных против различных комбинаций последовательностей-мишеней выбора наиболее эффективной последовательности с её дальнейшим изучением в экспериментальных и клинических исследованиях. Кроме того, в связи с использованием переносчика мяРНК, важно оценить активность различных антисмысловых комбинаций U1 мяРНК рибонуклеопротеина.

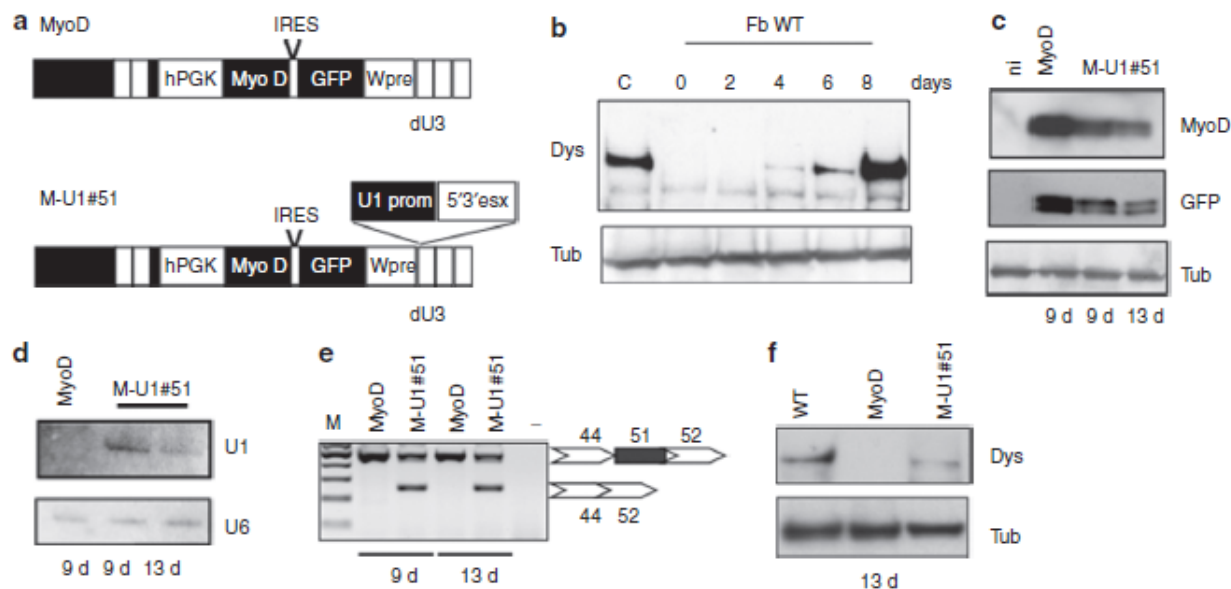


Рисунок 4 Направленная дифференцировка МДД Δ 45-50 фибробластов в миобласты и восстановление синтеза дистрофина при помощи пропуска экзона 51. (а) Схематическое представление последовательностей MyoD M-U1#51. U1 кассета экспрессии 5'3'esx последовательность была клонирована в область dU3. (b) Вестерн-блоттинг анализ с использованием анти-дистрофиновых (Dys) и анти-тубулиновых антител (Tub) на белках от MyoD-инфицированных фибробластов дикого типа (Fb WT) которые забирались на 0, 2, 4, 6, и 8 день после индукции дифференцировки (С: протеины из клеток скелетных мышц человека). Δ45-50 фибробласты вводились с MyoD или M-U1#51 и собирались на 9 и 13 дни дифференцировки. Образцы анализировались при помощи: (c) вестерн-блоттинга, на экспрессию MyoD и GFP, (d) нозерн-блоттинг, для выявления антисмысловых РНК последовательностей, (e) "вложенной" ОТ-ПЦР для обнаружения пропуска экзона, и (f) вестерн-блоттинг для установления синтеза дистрофина. В качестве контрольного метода исследования для выявления антител к анти-тубулину (Tub) был выполнен вестерн-блоттинг. кДНК, комплементарная ДНК; МДД, мышечная дистрофия Дюшенна; GFP, зелёный флуоресцентный белок кДНК; hPGK, промотор фосфоглицераткиназы человека; IRES, внутреннее место входа на рибосоме; MyoD, MyoD кДНК.

На основании U1 мяРНК было разработано десять различных последовательностей, комбинированных с антисмысловыми последовательностями, направленными против границ сплайсинга и ЭЭС, они были клонированы и оценены на стабильность *in vivo*, а также на способность индуцировать пропуск экзона 51. При оценке всех было показано стабильно накопление в клетке, несмотря на то, что размер U1 мяРНК значительно изменялся при дополнении антисмысловых последовательностей. Примечательно, что эти молекулы сохраняли возможность связываться с U1-70K белком, что является маркером для оценки стабильности U1 мяРНК частиц, что является причиной стабильного накопления в клетке.

Пропуск экзона 51 в каждой антисмысловой молекуле оценивался при инфицировании миобластов, полученных при биопсии пациентов с удалением экзона 48-50. Это позволило нам отобрать две наиболее оптимальные молекулы (5'3' и 5'3'esx), которые отличались от исходного ЭЭС только по дополнительному антисмысловому элементу в 5'3'esx

последовательности. Впоследствии их активность сравнивалась методом оценки сплайсинга с использованием люциферазы, при помощи которого была установлена большая активность последовательности 5'3'esx. Эти данные указывают, что ЭЭС участок-мишень, который входит в состав последовательности 5'3'esx, играет важную роль в сплайсинге экзона 51 и что, в отношении U1 мяРНК, может улучшить эффективность пропуска при образовании связи антисмысловых последовательностей границ сплайсинга. Эти результаты, с учётом того, что U1 последовательности, содержащие только анти-ЭЭС, обладают меньшей эффективностью, позволили нам предположить, что эффективность U1 мяРНК соответствует ожиданиям, прежде всего при выделении границ сплайсинга.* Вероятно, есть значимые различия с вектором U7 мяРНК, который эффективен для распознавания последовательностей ЭЭС, вне зависимости от участков^{20,21} и от синтетических олигонуклеотидов, и действует независимо от каких либо переносчиков РНК.^{17,18}

Активность наиболее эффективной последовательности окончательно тестировалась с использованием фибробластов пациентов, изменённых в ходе направленной дифференцировки, и содержащих различные генетические изменения (делеция 45-50). Очень важна возможность оценки активности индукции пропуска у фибробластов, полученных из кожных биоптатов, принимая во внимание, что биопсия мышечной ткани является инвазивным хирургическим вмешательством, а пациенты, страдающие МДД - преимущественно дети, ослабленные заболеванием.

Следовательно, результаты этих исследований указывают, что последовательность 5'3'esx проявляет большую активность в индукции пропуска экзона 51 при двух различных видах мутаций, лежащих в основе МДД, и в двух различных клеточных системах, и поэтому, возможно её дальнейшее изучение в доклинических и клинических исследованиях.

В выполненной ранее работе на мышцах было показано, что адено-ассоциированные вирусы (AAV), переносящие U1-антисмысловые кассеты экспрессии, являются очень хорошей системой для восстановления синтеза дистрофина во всём организме. Более того, данные о положительном действии этого метода лечения, которое сохраняется в течение всей жизни животного без каких либо вторичных/токсических

эффектов, наряду с данными о сохранении экспрессии после введения AAV векторов в мышцы нечеловекообразных приматов в течение >6 лет,³⁵ указывают на возможность использования этого подхода для длительного лечения людей, страдающих МДД. Использование этого подхода для лечения крупных животных или людей сопряжено со сложностями, поскольку требуется большая доза векторов, при этом есть опасность иммунного ответа на белки капсида вирусов, если потребуется их повторное введение. Однако, последние научные работы показали, что образования анти-AAV1 можно избежать использованием иммуномодуляции, выполняя протокол терапии с использованием AAV для лечения пациентов.^{36,37} Для адекватного ответа на соответствующие вопросы необходимо проведение клинических исследований и правильно спланированных лабораторных тестов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клоны антисмысловых последовательностей

U1#51 5'3': Первым клоном, полученным при помощи ПЦР, был описанный ранее U1-5' (см. 19) в U1 была введена двойная антисмысловая последовательность, которая уже была использована для U1#23.

Клоны U1#51 были получены при помощи ОТ-ПЦР с использованием последовательности pRRL-5'3'.

U1#51 ESE A:

U1#51AON1R
(5'-AGAAATGCCATCTTCCTTGAATGAGATCTTGGGCCTCTG
C-3');
U1F2 (5'-GGCAGGGGAGATACCATGATC-3').

U1#51ESEA:*

U1#51ESEA*F
(5'-AGATGGCATTCTAGGGCAGGGGAGATACCATGATC-3');
U1#51ESEA*R
(5'-TCCTTGATGTTGGAGATGAGATCTTGGGCCTCTGC-3')

U1#51ESEA+B:

U1#51AON1F
(5'-TCAAGGAAGATGGCATTCTGGCAGGGGAGATACCATGA
TC-3')
U1#51AON2R
(5'-ATCAAGTTATAAAATCACAGAGGATGAGATCTTGGGCCT
CTGC-3').

U1#513'ESEA:

U1#51-3'F
(5'-GTCTGAGTAGGAGCTAAAATATTTTGGGGCAGGGGAG
ATACCATGATC-3');
U1#51 AON1R
(5'-AGAAATGCCATCTTCCTTGAATGAGATCTTGGGCCTCTG
C-3')

U1#515'ESEB:

U1#51ESEBF
(5'-CCTCTGTGATTTTATAACTTGATGGCAGGGGAGATACCA
TGATC-3');
U1#515R
(5'-ATCAAGCAGAAGGTATGAGAAAAAATGAGATCTTGGGC
CTCTGC-3')

U1#515'3'ESEA:*

U1#515'3'ESEA*F
(5'-GGAAGATGGCATTCTAGGTCTGAGTAGGAGCTGGCAG
GGGAGATACCATGATC-3');
U1#515'3'ESEA*F
(5'-TTGATGTTGGAGCATCAAGCAGAAGGTATGAGATGAGAT
CTTGGGCCTCTGC-3')

U1#515'3'Esx:

U1#515'3'sxF
(5'-TCAAGGAAGATGGGTCTGAGTAGGAGCTGGCAGGGGAG
ATACCATGATC-3');
U1#515'3'sxR
(5'-TGTTGGAGCATCAAGCAGAAGGTATGAGATGAGATCTTG
GGCCTCTGC-3')

U1#515'3'Edx:

U1#515'3'dxF
(5'-TCCAACATCAAGGTCTGAGTAGGAGCTGGCAGGGGAGA
TACCATGATC-3');
U1#515'3'dxR
(5'-GGTACCTGCATCAAGCAGAAGGTATGAGATGAGATCTTG
GGCCTCTGC-3')

U1#515'3'L:

U1#515'3'LF
(5'-CAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCTAGGCAGGGGAGAT
ACCATGATC-3');
U1#515'3'LR
(5'-GATCAAGCAGAAGGTATGAGAAAAAATGAGATCTTGGG
CCTCTGC-3').

Эти фрагменты, полученные с помощью ПЦР, были обработаны <рестриктазой> *NheI* и введены в обработанный *NheI* остов лентивируса *pRRLSIN.cPPT.PGK/GFP.WPR*²⁹. Клон *pCCL-MyoD/5'3'esx* был получен из *pRRL-5'3'ESX* после реакции с эндонуклеазами *SalI* и *ScaI*, клонированная полученная последовательность была введена в *SalI-ScaI* - обработанные *pCCL-MyoD* (предоставлено Maurizia Caruso).

Клеточные культуры. Культуры первичных предшественников миобластов были впервые выделены из линии фибробластов, выращенной на среде Human Skeletal Muscle Growth Medium <Среду, индуцирующую направленную дифференцировку с образованием ткани скелетных мышц человека> (PromoCell, Хайдельберг, Германия) в увлажняемом инкубаторе, при 5% CO₂ и 37 °C.

Культуры первичных фибробластов были получены при выращивании клеток биоптатов кожи, полученных от пациентов с МДЦ и здоровых лиц в RPMI (Roswell Park Memorial Institute) на среде, содержащей 15% фетальной телячьей сыворотки, 1% пенициллина-стрептомицина 1% глутамина (GIBCO/BRL Life Technologies, Гранд-Айленд, Нью-Йорк). Условия, в которых находились фибробласты, были описаны выше.

Подготовка вируса и введение в клетку. Клетки 293T были распределены по чашке диаметром 25 см (три чашки/вирус) и заражены лентивирусными конструкциями, которые содержали плазмиды P1p1, P1p2, и P1pV/SVG (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) по методике с использованием введения четырёх плазмид, описанной ранее.²⁹

В течение последующих 2 дней после трансфекции собиралась надосадочная жидкость, которая центрифугировалась при помощи устройства Beckmann Ultracentrifuge с ускорением 20,000g в течение 2-х часов. Осадок был распределён в сбалансированном солевом буферном растворе Хенкса (Invitrogen).

Эффективность трансдукции оценивалась на инфицированных клетках HeLa: затем клетки собирались для выделения белков и РНК, для оценки экспрессии антисмысловых последовательностей и GFP, соответственно.

За день до введения, миобласты или фибробласты помещались на питательную среду, в чашки диаметром 60 мм (как минимум две для каждого отдельного вируса), с плотностью 5×10^5 клеток на чашку.

В следующие 2 дня они были дважды инфицированы лентивирусами в присутствии полибреина (4 мг/мл).

На второй день после последнего инфицирования, клетки вводились в Human Skeletal Muscle Differentiation Medium (PromoCell). Через 7 дней (для миобластов) или 9 и 13 дней (для фибробластов) дифференцировки, клетки были промыты при погружении в раствор фосфатного буфера (PromoCell) и собраны при помощи скребка для дёсен с 300 мл белкового буферного раствора [100 ммоль/л трис-НСl с рН 7.4, 1 ммоль/л ЭДТА, 2% натрия додецил сульфата, 1× Полный коктейль, подавляющий активность протеаз, не содержащий ЭДТА (Roche, Applied Science, Мангейм, Германия)] для выделения белка, или 1 мл реагента Тризол (Invitrogen) для выделения РНК.

Выделение и анализ белков. Белки выделялись из чашек с клетками с 100 ммоль/л трис-НСl (рН 7.4), 1 ммоль/л ЭДТА, 2% додецилсульфатом натрия (SDS) и коктейля, содержащего ингибиторы протеазы (Roche Applied Science, Мангейм, Германия). Образцы помещались в ротационный шейкер с температурой 4 °C на 30 минут, центрифугировались с 13,200 об/мин в течение 20 минут при 4 °C, собиралась надосадочная жидкость, которая содержала белок. Концентрация оценивалась при помощи ВСА (бизинхониновая кислота) (PIERCE; Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, Иллинойс), в соответствии с инструкцией производителя.

Вестерн-блоттинг. Пятьдесят мкг экстрактов белка (для дистрофина и тубулина) было помещено в NuPAGE трис-ацетат прибора Minigel 3-8% 1 мм (Invitrogen); 15 пг (на GFP и MyoD) было помещено в NuPAGE бис-трис прибора Minigel 10% 1 мм (Invitrogen).

Электрофорез и блоттинг выполнялись при помощи аппарата XCell SureLock Minicell (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя, белки помещались на блоттинг-мембрану из нитроцеллюлозы (Protran; Schleicher & Schuell BioScience, Кин, Нью-Гэмпшир).

Мембраны фиксировались 10% обезжиренным сухим молоком (Difco Skim Milk; Becton & Dickinson, Le Pont de Claix, Франция), инкубировались в течение 1 часа с первичными антителами [к дистрофину: NCL-DYS1 (Novocastra, Ньюкасл-апон-Тайн, Великобритания) в растворе 1:40 в 3% молока; на тубулин: анти-тубулин AA12 (Santa Cruz Biotechnology,

Санта Круз, Калифорния) в растворе 1:200 в трис-буферном физиологическом растворе с детергентом Твин 20; на GFP: анти-GFP ab290 (AbCAM, Кэмбридж, Великобритания) растворённом в 1:2,500 трис-буферном физиологическом растворе с детергентом Твин 20; на MyoD: анти-MyoD 5.8 A (Santa Cruz Biotechnology), растворённом 1:500 в 2% молоке], промывался трис-буферным раствором с детергентом Твин 20 (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури), и инкубировались с антимышиными IgG козла (H+L), конъюгированными с пероксидазой хрена вторичными антителами (растворённым 1:5,000 в 3% молоке) на дистрофин, тубулин, и MyoD, или ImmunoPure козий анти-кроличий IgG, конъюгированный с пероксидазой (PIERCE; Thermo Fisher Scientific) на GFP в течение 1 часа. Для выделения белков использовался хемиллюминесцентный субстрат SuperSignal (PIERCE; Thermo Fisher Scientific).

Подготовка и анализ РНК. Клетки собирались с использованием 1 мл Тризола (Invitrogen), выделение РНК проводилось в соответствии с руководством производителя; концентрация оценивалась при помощи спектрометра Nanodrop ND-1000 (CELBIO, Рего, Милан, Италия).

ОТ-ПЦР. мРНК дистрофина анализировалась при помощи ОТ-ПЦР с использованием РНК общим количеством 200 нг с олигонуклеотидом E46F (5'-GCTAGAAGAACAAGAAATAT-3') для делеции 48-50 или нуклеотидом E43F (5'-CTACAACAAGCTCAGGTGC-3') для делеции 45-50 и E54R (5'-CTTTTATGAATGCTTCTCCAAG-3') для 40 циклов системы ОТ-ПЦР Access (Promega, Мадиссон, Висконсин). Четыре микролитра продуктов ОТ-ПЦР были, затем использованы в качестве образца для "вложенной" реакции, которая выполнялась с использованием олигонуклеотидов E47F (5'-TТАCTGGTGGAAAGAGTTGCC-3') и E52Ro (5'-TTCGATCCGTAATGATTGTCTAGCC-3'), было проведено 30 циклов.

10 мкл реагентов было помещено на 2% агарозный, этидия бромидный гель, который оценивался при помощи УФ излучения.

Нозерн-блоттинг. Методика нозерн-блоттинга уже была описана ранее.³⁸ Вкратце, 10 мкг от общего количества РНК было помещено в 6% полиакриламидный гель, проводился электрофорез с 17 mA, на нитроцеллюлозной мембране Hybond-N + (Amersham, GE Healthcare Life sciences, Бакингемшир, Великобритания) в течение 16 часов с напряжением 10 вольт и температурой 4 °C. Мембраны гибридизировались с образцами проб a-U1 (5'-CAGGGGAAAGCGCGAACGCAGTCCCCCA-3'), проводилось определение с использованием системы Typhoon TRIO Variable Mode Imager (Amersham, GE Healthcare Life sciences), с программой ImageQuant TL.I program.

Последовательность рLuc-ex51. Вставка ex51 была получена при помощи ПЦР с ДНК генома с использованием олигонуклеотидов:

5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGATGAGAATGAGCAAAATCGT-3'

и

5'-CCTTAATTAAGAGACAАСТАТТСТТГТААГ-3'.

Основания, выделенные курсивом - *NotI* и *PacI* рестрикционные участки.

Ex51 включает в свой состав целиком экзон 51, соединённый 268 парами оснований интрона 50 и 263 парами оснований интрона 51. Фрагменты, полученные при помощи ПЦР, были обработаны при помощи *NotI* и *PacI* и ферментов и введены в *NotI* и *PacI*-с вектором pcDNA3.1-Luc.³²

C27 трансфекции. C2.7 миобласты -³⁹ клетки миогенного происхождения, полученные из C2 линии клеток мышечной, выделенных из активированных миосателиоцитов.⁴⁰ C2.7 клетки были помещены в 35 мм чашки; выполнена их трансфекция с использованием 2мкг рLuc-ex51, 2мкг лентивирусного вектора, несущего кассету экспрессии антисмысловой последовательности и 50 нг последовательности, вызывающей экспрессию люциферазы Ренилла, что использовалось для контроля эффективности трансфекции. Трансфекция выполнялась в соответствии с протоколом использования Липофектамина 2000 (Invitrogen). Клетки выращивались на модифицированной Dulbecco's среде Eagle's - 10% фетальной бычьей сыворотке в течение 36 часов.

Оценка люциферазы. C2.7 клетки собирались с использованием 250 мкл буферного раствора, предотвращающего их лизис, проводилась оценка с использованием протокола Dual-Luciferase Reporter Assay System protocol (Promega).

БЛАГОДАРНОСТИ

... Эта работа выполнена при частичной поддержке грантов: Telethon (GGP07049), Родительский проект Италии, Европейский проект SIROCCO (LSHG-CT-2006-037900), ESF проект "NuRNASu" и PRIN. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА
(не переведено)

Оригинал статьи находится по адресу:

http://www.parentprojectmd.org/site/DocServer/Exon_skipping_51_with_U1snRNA_--_Bozzoni_Mol_Ther_2010.pdf?docID=9782