

МНОЖЕСТВЕННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ КУРКУМИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ТРАНСКРИПТА SMN2 ЭКЗОНА 7

Dairong Feng^{1,2,3} Yi Cheng^{1,5} Yan Meng^{1,4} Liping Zou⁴ Shangzhi Huang¹ Jiuyong Xie^{2,3}

Статья получена 4 мая 2015 / Принята 14 августа 2015 Издательство Шпрингер-Ферлаг Берлин Гейдельберг 2015

АННОТАЦИЯ Ген фактора выживаемости моторных нейронов 2 (SMN2) это ген-модификатор при спинальной мышечной атрофии (СМА), нейродегенеративном заболевании, которое вызывается недостаточным содержанием белка SMN, что преимущественно обусловлено дефектом SMN1. SMN2 практически идентичен SMN1, но он, к сожалению, способен производить лишь небольшое количество полноценного белка SMN из-за пропуска экзона 7. Транскрипт SMN2, содержащийся в экзоне 7 (SMN2_E7+), может увеличиваться с помощью пищевого продукта куркумина, хотя связанные с этим молекулярные изменения пока не ясны. В работе обнаружено, что у пациентов со СМА 2 типа куркумин повышал инклюзию экзона 7 в SMN2 в фибробластных клетках. Изучение потенциальных факторов сплайсинга показало, что куркумин специфически повышал содержание белка и транскрипта SRSF1. Повысившийся белок SRSF1 был в основном нуклеарным и гиперфосфорилированным. Что интересно, воздействие куркумина на транскрипты SMN2 и SRSF1 подавлялось ингибитором деацетилазы белка трихостатином А. Более того, в поддержку его роли в сплайсинге SMN2 говорит и тот факт, что снижение экспрессии SRSF1 сокращало инклюзию экзона 7 в SMN2. Представляется, таким

образом, что куркумин оказывает множественное действие на транскрипт SMN2 и регуляторы его сплайсинга, в том числе изменения альтернативного сплайсинга, уровень транскрипта/белка и его фосфорилирование. Представляется, что в это воздействие вовлечены белковые деацетилазы и фосфатазы. Интересно отметить, что, как представляется, все аспекты такого воздействия благотворно влияют на продуцирование транскрипта SMN2_E7+ в клетках пациентов со СМА.

Ключевые слова: куркумин, SMN2, сплайсинг, SRSF1, фосфорилирование

ВВЕДЕНИЕ

Спинальная мышечная атрофия (СМА) представляет собой аутосомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание с частотой встречаемости 1 на 6000 рождений. СМА является основной генетической причиной младенческой смертности (Monani 2005; Burghes and Beattie 2009). Для данного заболевания характерна дегенерация α-моторных нейронов в переднем роге спинного мозга с последующей атрофией скелетных мышц (Monani 2005; Burghes and Beattie 2009). У более 96 % больных СМА отмечается недостаток белка, ответственного за выживаемость моторных нейронов (SMN) из-за гомозиготной делеции гена SMN1 (Coover et al. 1997; Lefebvre et al. 1995). Следует отметить, что паралогичный человеческий ген SMN2 кодирует тот же белок SMN, но только в небольших количествах (Lefebvre et al. 1995; Kashima et al. 2007), по причине разной степени пропуска экзона 7 в различных клетках/тканях (Burnett et al. 2009; Lorson et al. 1998). Из всех тканей с дефицитом SMN (Zhang et al. 2008), спинной мозг затрагивается в наибольшей степени в отношении его функционирования и выживаемости (Burghes and Beattie 2009; Chen et al. 2008).

Как показано, переход С6-Т в экзоне 7 гена SMN2,

Shangzhi Huang: hsz_pumc@ibms.pumc.edu.cn; Jiuyong Xie: xiej@umanitoba.ca

1 Department of Medical Genetics, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

2 Department of Physiology and Pathophysiology, College of Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, MB R3E 0J9, Canada

3 Department of Biochemistry and Medical Genetics, College of Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, MB R3E 0J9, Canada

4 Department of Pediatrics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

5 Present Address: Department of Diagnostic Ultrasound, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China

также приводит к пропуску, разрывая связь активатора сплайсинга SRSF1 (богатый серином/аргинином фактор сплайсинга 1) (Cartegni and Krainer 2002; Cartegni et al. 2006) и/или провоцируя связывание репрессора сплайсинга hnRNP A1 (гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1) (Kashima et al. 2007; Kashima and Manley 2003). Еще один репрессор сплайсинга экзона 7 в SMN2 SAM68 (Src-ассоциированный субстрат в митозе 68 кД) (Pedrotti et al. 2010). Вероятно, в регулировании принимают участие и другие факторы; об этом, в частности, свидетельствует воздействие антисмысловых олигонуклеотидов на другие участки SMN2 пре-мРНК (Singh et al. 2006; Hua et al. 2010).

Хотя экспрессия SMN2 недостаточна для того, чтобы компенсировать гомозиготную потерю SMN1 (Lefebvre et al. 1995), множественные копии SMN2 увеличивают содержание белка SMN и обратно коррелируют с тяжестью заболевания у больных СМА и трансгенных мышей (Hsieh-Li et al. 2000; Monani et al. 2000; Wirth et al. 2006; Swoboda et al. 2005). Таким образом, в качестве гена-модификатора для СМА, альтернативный сплайсинг экзона 7 в SMN2 может служить новым потенциальным подходом к терапии СМА (Hua et al. 2010).

Куркумин представляет собой пищевое полифеноловое вещество, которым особенно богат желтокорень канадский (корень куркумы). Он применялся в клинических испытаниях в отношении многих болезней человека (Gupta et al. 2013; Darvesh et al. 2012). Представляется, что он регулирует множественные факторы, включая гистоновую ацетилтрансферазу (Shishodia 2013; Shishodia et al. 2007). Сообщалось также о том, что он увеличивает содержание транскрипта SMN2_E7+ и белка SMN в фибропластах пациентов со СМА 1 типа (Sakla and Lorson 2008); в то же время, сопутствующие молекулярные изменения пока неясны. Для лечения заболеваний человека (Gupta et al. 2012), необходимо выявить его потенциальные объекты воздействия и эффекты.

В настоящей работе сообщается, что куркумин повышает экспрессию транскрипта SMN2_E7+ и белка SMN в фибробластах у пациентов со СМА со множественными воздействиями: расширением инклюзии экзона 7 в SMN2, повышением уровня транскрипта/белка и фосфорилированием активатора сплайсинга SRSF1. Это воздействие, вероятно, включает деацетилазу и фосфатазу

РЕЗУЛЬТАТЫ

Куркумин повышает содержание белка SMN и пропорцию транскрипта SMN2_E7+ в фибробластах больных СМА 2 типа

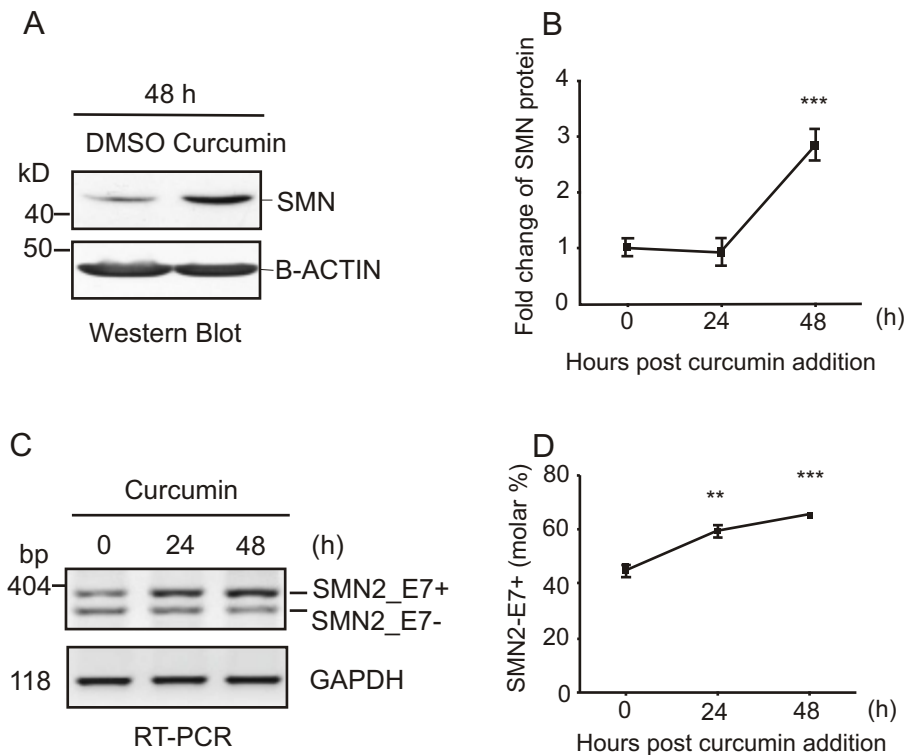
Для изучения потенциального воздействия куркумина на экспрессию белка SMN и экзон 7 в SMN2 была выделена клеточная линия фибробластов кожи (BJ301J), полученная посредством кожной биопсии пациента (СМА 2 типа, возраст 6 мес., мальчик), у которого отмечен дефицит обеих копий гена SMN1 и наличие трех копий SMN2 (Рис. S1 и S2). В наших первоначальных тестах 1525 μ M куркумина увеличивало содержание транскрипта SMN2_E7+, но только количество 25 μ M было достаточным для положительной регуляции уровня белка SMN. Поэтому в последующих экспериментах мы использовали 25 μ M куркумина на этих клетках. При 25 μ M куркумин эффективно повышал уровень белка SMN в клетках BJ301J: в 1,8 раза после 48 часов обработки (Рис. 1a, b, $p < 0.001$). В соответствии с положительной регуляцией, процентное содержание транскрипта SMN2_E7+ существенно увеличивалось: с 45,0 % ($\pm 2,2$ %, $n = 3$, при расчете на молекулярном уровне, как и в последующем) при 0 час. до 59,1 % ($\pm 2,3$ %, $n = 3$, $p < 0.01$) при 24 час., и далее до 65,1 % ($\pm 0,9$ %, $n = 3$, $p < 0.001$) при 48 час. (Рис. 1c, d) при воздействии куркумина.

Вызванное куркумином увеличение варианта SMN2_E7+ ингибируется трихостатином А, ингибитором деацетилазы

Куркумин ингибирует гистоновую ацетилтрансферазу (ГАТ) и фосфатазы 2A и 5 (Balasubramanyam et al. 2004; Han et al. 2012). Чтобы выяснить, влияют на увеличение куркумином SMN2_E7+ деацетилирование или фосфорилирование, клетки BJ301J подвергались предварительной обработке трихостатином А в течение 2 часов (TSA, 1 μ M), ингибитором деацетилазы в гистоновых и негистоновых белках (Dokmanovic et al. 2007; Glozak and Seto 2007), или омега-3 кислотой (ОА, 10 nM), ингибитором белковых Ser/Thr фосфатаз PP1 и PP2A (Bialojan and Takai 1988), соответственно, перед обработкой куркумином в течение 24 час. (Рис. 2a). Предварительная обработка TSA, в отличие от ОА, препятствовала увеличению процентного

Рис. 1. Куркумин увеличивает содержание белка SMN и пропорцию транскрипта SMN2_E7+ в фибробластах пациента со СМА 2 типа.

А вестерн-блоттинг содержания белка SMN в клетках, обработанных ДМСО или куркумином в течение 48 часов
В время изменений (среднее \pm SD, n = 3, относительно β -ACTIN), как в А
С агарозный гель продуктов ОТ-ПЦР вариантов SMN2 (E7+ и E7-) в цитоплазме клеток, обработанных куркумином в течение определенного времени
Д время изменений экзон 7-содержащего транскрипта SMN2 (SMN2_E7+ мол%), рассчитанное как молярная интенсивность 364-bp продукта (SMN2_E7+) относительно общего количества 364- и 310-bp (SMN2_E7-) продуктов (среднее \pm SD, n = 3) в каждой полосе геля, как в С. **p<0,01, ***p<0,001, относительно времени 0



содержания транскрипта SMN2_E7+ куркумином, по данным анализа ПЦР в реальном времени (полоса 3 против полосы 2). Таким образом, вызванное куркумином увеличение содержания варианта SMN2_E7+ специфически ингибируется ингибитором белковой деацетилазы TSA, что говорит о том, что для регуляции необходима стадия деацетилирования.

Куркумин специфически повышает SRSF1 как на уровне белка, так и на уровне транскрипта

Для определения транс-действующих факторов куркумина мы исследовали некоторые из них с точки зрения использования экзона 7, включая SRSF1, ядерный белок hnRNP A1 и SAM68. общий белковый уровень SRSF1 увеличивался после 24-часового воздействия куркумина по данным вестерн-блот анализа (Рис. 3а). Увеличение было ясно видно также и в ядре при иммуноокрашивании (Рис. 3б). Напротив, содержание белка SAM68 уменьшилось (Рис. 3а, б). В соответствии с изменениями их белка, содержание транскриптов SRSF1 и SAM68 мРНК увеличилось существенно, на 144,6% (\pm 21.8%, n = 3, p<0.01) либо уменьшилось на 19,8% (\pm 1.2%, n = 3, p<0.001), соответственно (Рис. 3с). Белок HnRNP A1 не претерпел значительных изменений, ни с точки

зрения количества, ни транскриптов (Рис. 3). Таким образом, SRSF1 и SAM68 специфично регулируются куркумином в отношении количества белка и транскриптов.

Куркумин повышает содержание гиперфосфорилированной изоформы SRSF1 в ядре

Для дальнейшего изучения факторов сплайсинга, регулируемых куркумином, мы исследовали статус фосфорилирования ядерного SRSF1, требуемого для локализации ядер/спеклов SRSF1 и активации зарождающихся транскриптов (Ngo et al. 2005). Для этой цели использовались четко разделенные цитоплазматические и ядерные белки, о чем свидетельствует эксклюзивное наличие GAPDH и hnRNP F/H в соответствующих фракциях (Рис.4а, слева). Анализ этих фракций показал, что увеличение общего количества белка SRSF1 наблюдалось преимущественно в ядре (Рис.4 а, справа). Кроме того, из двух полос ниже 35 кДа, опознанных антителом SRSF1 (клон 96), именно первая полоса при 34 кДа значительно увеличилась в ядре при воздействии куркумина. Следовательно, куркумин повышает содержание специфической изоформы ядерного белка SRSF1.

Нижняя полоса SRSF1 при примерно 32 кДа ясно

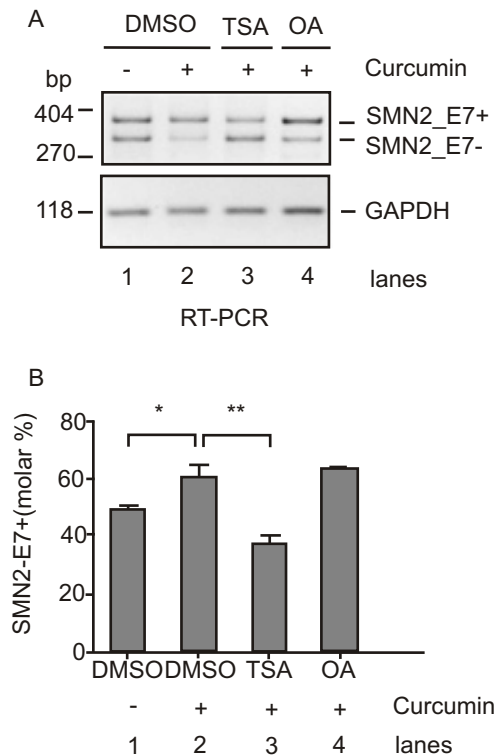


Рис. 2. Индуцированное куркумином повышение количества варианта SMN2_E7+ ингибируется трихостатином А

А ОТ-ПЦР-анализ вариантов (E7+ and E7-) в цитоплазме фибробластов BJ301J после 2 часов предварительной обработки TSA или ОП и последующим добавлением куркумина в течение 24 часов. Ген GAPDH РНК как контроль

В гистограмма, отражающая молярное процентное содержание экзон 7-содержащего транскрипта SMN2 (SMN2_E7+ мол%), рассчитанное как молярная интенсивность 364-бр продукта (SMN2_E7+) относительно общего количества 364- и 310-бр (SMN2_E7-) продуктов (среднее \pm SD, $n = 3$) в каждой полосе геля, как в А. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, сравнение отмеченных образцов

наблюдается при 4 мМ NaF в лизатах белка (Рис.4а); однако она отсутствует при использовании более высоких концентраций NaF (10 мМ) was used (Рис.4b), что позволяет предположить, что это менее фосфорилированная изоформа. Для изучения фосфорилирования двух изоформ SRSF1 при воздействии куркумина применялась иммунопреципитация (ИП) белка SRSF1 из цитоплазматической фракции с последующей обработкой щелочной фосфатазой кишечника телят (CIAP) (Рис.4с). При обработке CIAP исчезало ~34-кДа SRSF1 по сравнению с необработанными лизатами клеток или SRSF1, осажденными в вестерн-блоте ИП-образцов (полоса 2 в сравнении с 1 и 3). Соответственно, в том же CIAP-обработанном образце появлялась гораздо более низкая полоса

примерно при 30 кДа (полоса 2). По-видимому, рост ~34-кДа SRSF1 при воздействии куркумина представляет собой гиперфосфорилированную изоформу.

Индукционное куркумином увеличение SRSF1 ингибируется трихостатином А (TCA)

Чтобы выяснить, влияет ли TCA также на регуляцию куркумином SRSF1, мы рассматривали уровни белка и транскрипта в клетках BJ301J, на которые предварительно воздействовал ингибитор деацетилазы TCA (2 часа), после чего проводилась обработка куркумином (24 часа). При этом количество белка SRSF1 также увеличивалось в ядерной фракции при добавлении куркумина (Рис.5а). Напротив, индуцированное куркумином увеличение ядерного белка SRSF1 сокращалось при предварительном воздействии TCA (Рис.5а). В сочетании с изменением количества белка, регуляция транскрипта SRSF1 ($244,6 \pm 21,9\%$, $n = 3$, $p < 0,01$, Рис.5b) куркумином в сравнении с ДМСО исчезала при предварительном воздействии TCA ($117,0 \pm 11,4\%$, $n = 3$, $p < 0,001$, Рис.5b). Следовательно, стадия деацетилирования белка, по всей видимости, также необходима и для индуцированного куркумином увеличения количества транскрипта/белка SRSF1.

Нокдаун белка SRSF1 понижает инклюзию экзона 7 SMN2

Чтобы определить роль SRSF1 в использовании экзона 7 в SMN2 и в воздействии куркумина, мы применяли лентивирусный вектор-опосредованный нокдаун мшРНК SRSF1 в клетках BJ301J (Рис.6а). В клетках, псевдо-обработанных или экспрессирующих интерферирующую мшРНК, молярный процент варианта SMN2_E7+ возрастал от ~43,7-56,1% при воздействии куркумина (Рис.6b, вверху, полосы 1-4). При нокдауне SRSF1 содержание транскрипта SMN2_E7+ значительно сокращалось до 32,5% ($\pm 1,4\%$, $n = 3$, $p < 0,01$, полоса 5 полосы 1 и 3). Воздействие куркумина также делало возможным увеличение уровня, но всего лишь до 44,0% ($\pm 1,9\%$, $n = 3$, полоса 6), то есть значительно меньше, чем в контрольных образцах ($p < 0,001$, полосы 2 и 4). Напротив, при нокдауне мшРНК A1 базальный уровень сплайсинговых вариантов SMN2 не изменялся (полосы 7-8). Таким образом, нокдаун SRSF1 понижает процентное содержание

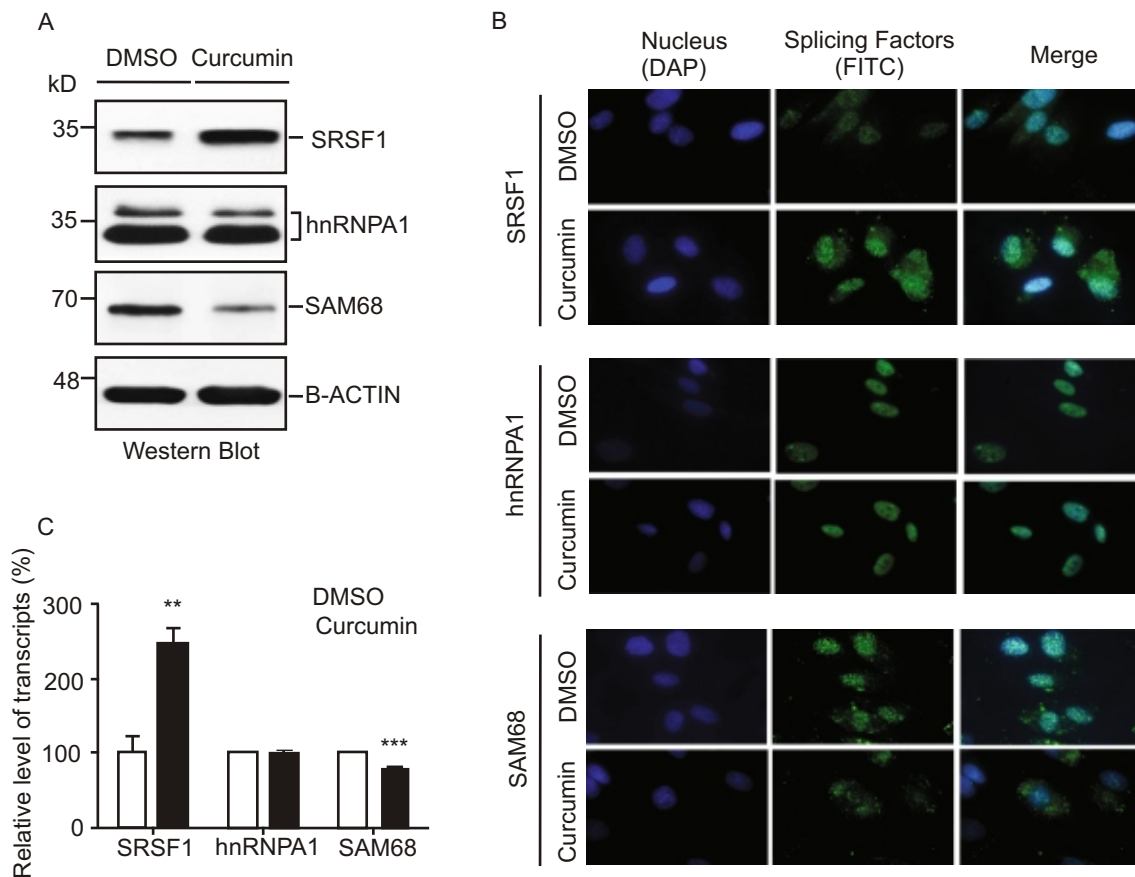


Рис. 3. SRSF1 специфически увеличивается куркумином
 А репрезентативный вестерн-блоттинг общего количества белков факторов сплайсинга, вовлеченных в регуляцию альтернативного сплайсинга экзона 7 при 24-часовой обработке клеток VJ301J ДМСО или куркумином. Белок β-ACTIN как контроль.
 В Иммуноокрашивание факторов сплайсинга (зеленый) в клетках VJ301J при 24-часовой обработке ДМСО или

куркумином. Ядра окрашены DAPI (синий)
 С Гистограмма количества транскрипта при анализе ОТ-ПЦР факторов сплайсинга (среднее ± SD, n = 3) при 24-часовой обработке ДМСО или куркумином. Каждый транскрипт нормализуется относительно GAPDH и затем относительно ДМСО-обработанного образца, принятого за 100%. **p<0.01, ***p<0.001, в сравнении с ДМСО-обработанными образцами

инклюзии экзона 7 в клетках больных СМА, то есть SRSF1 действует как слабый активатор сплайсинга экзона 7 SMN2. Однако он не является необходимым для расширения инклюзии экзона 7 куркумином, что говорит о наличии дополнительных факторов, влияющих на действие куркумина.

В целом приведенные данные говорят о том, что куркумин как пищевое соединение оказывает множественное воздействие на SMN2 и регуляторы его сплайсинга, повышая экспрессию транскриптов SMN2_E7+ в фибробластах при СМА. Такое воздействие, по-видимому, связано с деацелированием и/или фосфорилированием белка

Обсуждение

Фибробласты больных СМА 1 использовались для изучения регуляции сплайсинга SMN2 пре-мРНК низкомолекулярными соединениями (Sakla and

Lorson 2008; Dayangac-Erden et al. 2011). В настоящем исследовании клетки VJ301J были получены от пациента (мальчик, возраст 9 месяцев) со СМА 2 типа. SMN1 гомозиготно удален, но имеются три копии гена SMN2 (Рис.С1) и на одну копию SMN2 больше, чем в клетках GM3813, о чем сообщалось ранее (СМА 1 типа, мальчик, 3 года; Sakla and Lorson 2008; Dayangac-Erden et al. 2011). В обоих типах клеток увеличение процентного содержания транскриптов SMN2_E7+ идентично (примерно в 1,5 раза) при 24-часовой обработке 25 мкМ куркумина. Такое сходство изменений позволяет предположить, что куркумин схожим образом влияет на стимулирование продуцирования полномерного транскрипта SMN2 в клетках пациентов со СМА различного происхождения и разных типов.

Куркумин оказывает плейотропное воздействие на разные объекты в клетках (Shishodia 2013; Shishodia

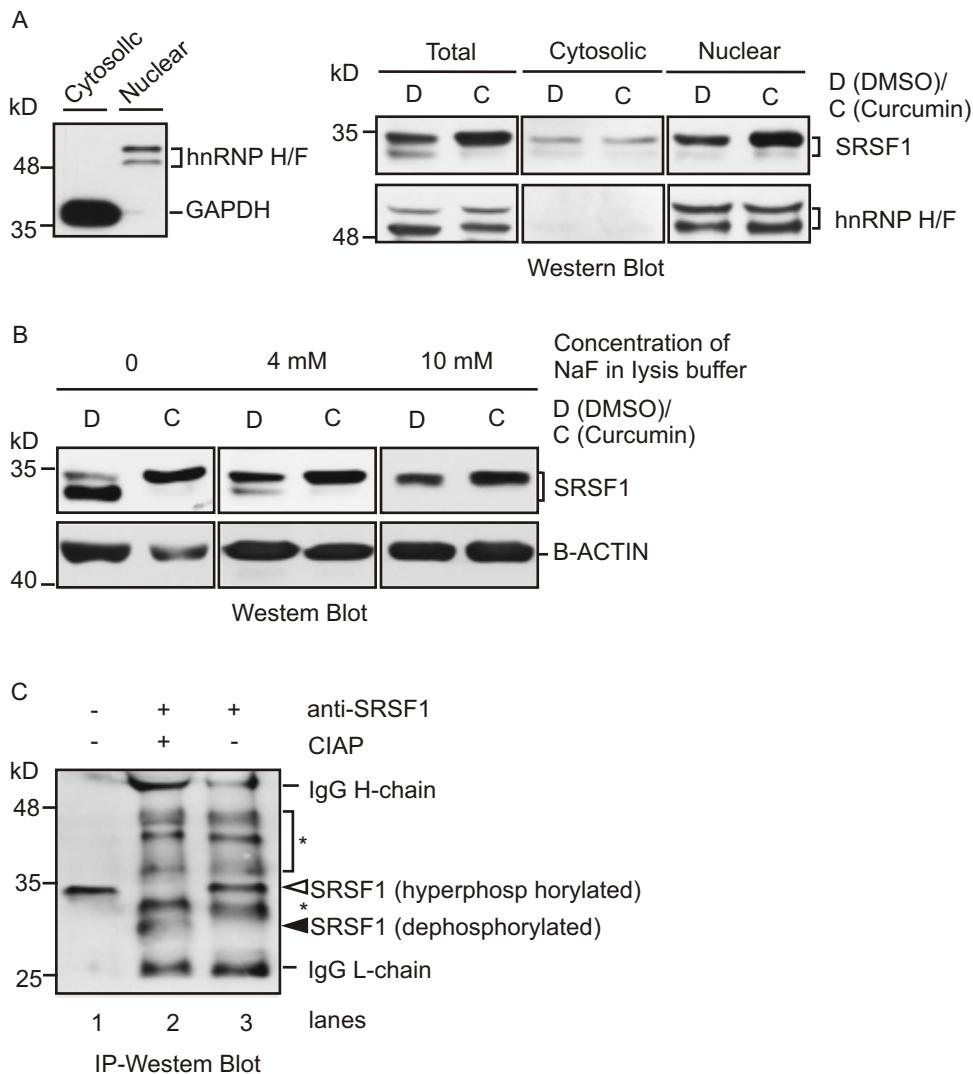


Рис. 4. Куркумин увеличивает количество гиперфосфорилированных изоформ SRSF1 в ядрах
 А слева: вестерн-блоттинг фракционирования цитозоли и ядра клеток VJ301J; GAPDH и мшРНК H/F как специфические маркеры цитозольной и ядерной фракций, соответственно. Справа: вестерн-блоттинг экспрессии SRSF1 в общем количестве лизатов (Т), цитозольной (С) и ядерной (N) фракциях клеток VJ301J при 24-часовой обработке ДМСО или 25 мкМ куркумина. Белок мшРНК H/F как контроль. Для всех образцов лизатов показаны две полосы, обе из которых опознаются по антителу SRSF1 (клон 96)

В вестерн-блоттинг изоформ белка SRSF1 в общем количестве лизатов с дополнением различных концентраций NaF. Нижняя полоса SRSF1 при обработке куркумином относительно слабее, чем у лизатов ДМСО-обработанных клеток и отсутствует при применении более высоких концентраций NaF (10 мМ). Белок β-ACTIN как контроль
 С вестерн-блоттинг цитоплазматического белка SRSF1 в обработанных куркумином фибробластах VJ301J с или без CIAP. Черными и неокрашенными треугольниками отмечены гиперфосфорилированные и дефосфорилированные изоформы SRSF1, соответственно.
 *Неспецифические полосы

et al. 2007), особенно на гистоновую ацетилазную ферментацию р300-/CREB-связывающего белка (р300/CBP) (Balasubramanyam et al. 2004). Среди различных эффектов куркумина можно выделить изменения в уровнях сплайсинга и транскриптов (Рис. 1, 2, 3) благодаря ингибированию им р300/CBP и ацетилированию белка/гистона (Balasubramanyam et al. 2004). Это подтверждается ингибированием такого воздействия куркумина ингибитором гистоновой деацетилазы (ГДАЦ) TSA (Рис. 2, 5). Показано, особенно в отношении SRSF1,

что куркумин ингибирует гистоновое ацетилирование/транскрипцию факторов, связанных с деградацией мРНК посредством НМД, соответственно увеличивая содержание направленных на НМД вариантных транскриптов SRSF1 variantв клетках (Feng et al. 2015). Ингибитор HDAC также может увеличить процессивность РНК-полимеразы II и сократить сотранскрипционные ассоциации регуляторов сплайсинга с определенными альтернативными экзонами (Hnilicova et al. 2011), что может препятствовать расширяемому

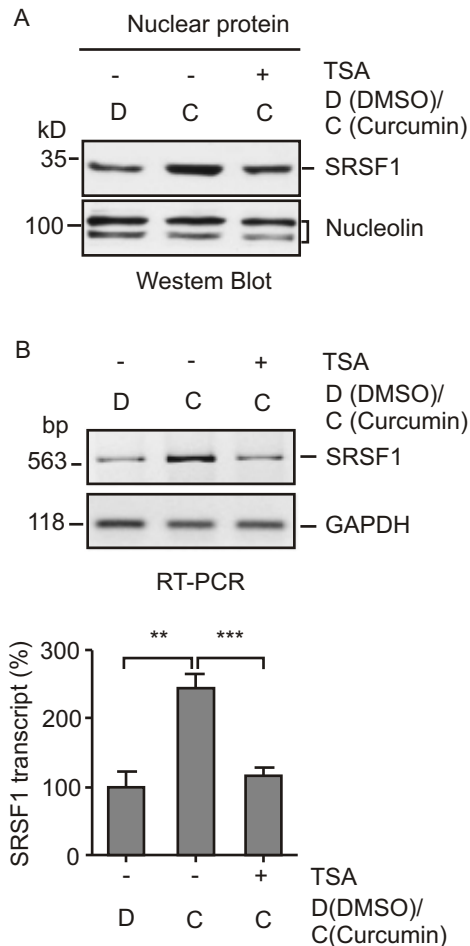


Рис. 5. Индуцированное куркумином повышение количества SRSF1 ингибируется трихостатином А (ТСА) А вестерн-блоттинг белка SRSF1 в ядрах клеток BJ301J при 2-часовой предварительной обработке с или без ТСА с последующим 24-часовым добавлением ДМСО или куркумина. Нуклеолиновый ядерный белок как контроль Вверху: ОТ-ПЦР-анализ транскриптов SRSF1 в цитоплазме фибробластов BJ301J при 2-часовой обработке с или без ТСА с последующим 24-часовым добавлением ДМСО или куркумина. Белок GAPDH РНК как контроль Внизу: гистограмма изменений транскрипта SRSF1 (среднее \pm SD, n = 3), как вверху. Транскрипт SRSF1 нормализован по GAPDH и по образцу, обработанному ДМСО без ТСА (-), принятому за 100%. **p<0.01, ***p<0.001, в сравнении с отмеченными образцами

куркумином использованию экзона 7. Воздействие куркумина на сплайсинг SMN2 и фосфорилирование SRSF1 (Рис. 1, 2, 4) также может включать ингибирование фосфатазы типа PP1 и PP2A. PP1 привязана к бета-4-слою домена РНК recognition motif (RRM1) SRSF1, дефосфорилируя таким образом фактор сплайсинга (Novoyatleva et al. 2008). Ингибирование PP1 стимулирует инклюзию экзона 7 SMN2 в фибробластах больных СМА и спинном мозге мышей со СМА (Novoyatleva et al. 2008).

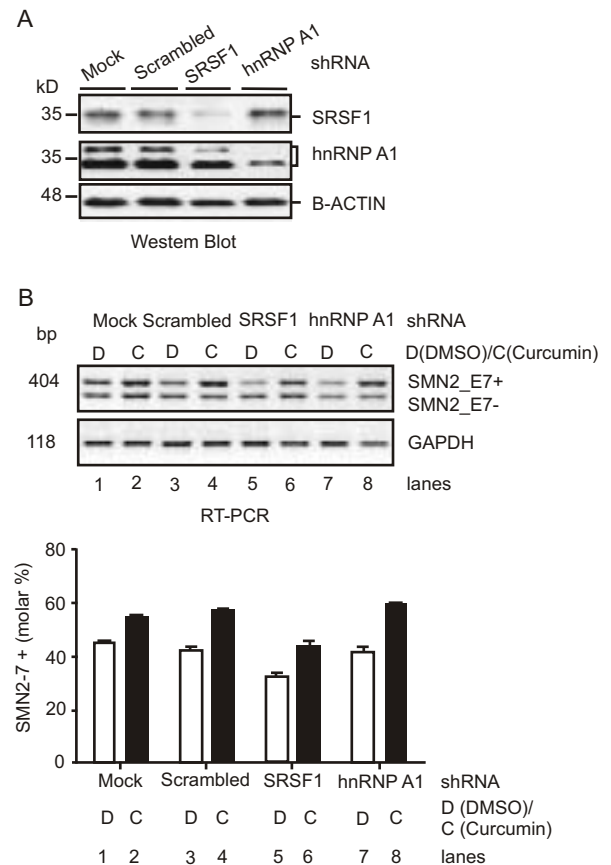


Рис. 6. Нокадаун SRSF1 сокращает инклюзию экзона 7 SMN2. А вестерн-блоттинг SRSF1 или мшРНК А1 клеток BJ301J через 7 дней после трансдукции лентивирусных частиц с интерферированной мшРНК. Белок β -ACTIN как контроль Вверху: агарозные гели ОТ-ПЦР-продуктов вариантов SMN2 в цитоплазме клеток BJ301 после нокадаун отмеченными факторами. Клетки подвергались 24-часовому воздействию ДМСО или куркумина через 7 дней после трансдукции. GAPDH РНК как контроль. Внизу: гистограмма молярного процентного содержания экзон 7-содержащего транскрипта SMN2 (SMN2_E7+), рассчитанного как молярная интенсивность 364-bp-продукта (SMN2_E7+) относительно общего количества 364- и 310-bp (SMN2_E7-) продуктов (среднее \pm SD, n = 3) для каждой полосы геля, показанной в верхней части рисунка

И PP1, и PP2A могут ингибироваться оокадаевой кислотой (ОК). Активность PP2A также может ингибироваться куркумином (Han et al. 2012). В наших опытах, однако, предварительная обработка ОК не влияла на действие куркумина на инклюзии. Экзона 7 в клетках (Рис. 2). Разумное объяснение этому заключается в том, что накладываются друг на друга действия куркумина и ОК на фосфатазы и, соответственно, на фосфорилирование факторов сплайсинга экзона 7 SMN2. В наших опытах (Рис. 4с) эффективная

иммунопреципитация ядерного белка SRSF1 не удалась, вероятно, из-за того, что был занят фосфатазами его домен RRM1 (Novoyatleva et al. 2008), который является частью N-терминального антигена, на который направлено действие антитела SRSF1.

В целом наблюдалось множественное воздействие куркумина на экспрессию генов, вовлеченных в продуцирование полноценного белка SMN2. Такое воздействие на транскрипцию/сплайсинг гена и фосфорилирование белка может усиливаться ингибиторным эффектом куркумина на гистоновую ацетил-трансферазу p300/CBP белковые фосфатазы.

Оба этих момента равно важны для всеобъемлюще положительного воздействия на продуцирование полноценного белка SMN2.

Материалы и методика

Культура клеток и обработка

Фибробласты человека (BJ301J) были получены у больного СМА (мальчик возраста 9 месяцев) с тремя копиями гена SMN2 gene и содержались в DMEM (модифицированной по способу Дульбекко среде Игла) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 mM глутамина и 1% раствора пенициллина-стрептомицина (Invitrogen) при 37°C в увлажненной атмосфере с содержанием 5% CO₂. Клетки обрабатывались ДМСО или 25 мкМ куркумина (Sigma-Aldrich) в течение 0, 24 или 48 часов. При анализе действия ингибиторов на транскрипт SMN2 или SRSF1 клетки предварительно подвергались воздействию каждого ингибитора в течение 2 часов с последующим 24-часовым добавлением DMSO или 25 мкМ куркумина.

Нокдаун факторов сплайсинга посредством лентивирусной вектор-опосредованной трансдукции

Лентивирусные частицы приготавливались с использованием плазмидов мшPHK pGIPZ-shSRSF1 (Open Biosystems, RMM4431-99938975, 50-TCG AGA TCG AGA TCT TCC A-30), pGIPZ-shhnRNPA1 (50-GTG TAA AGC ATT CCA ACG A-30), и pGIPZ-интерферированной (50-TAG TGA AGC CAC AGA ATA T-30), согласно нашим прежним процедурам (Liu et al. 2012; Yu et al. 2009). Клетки подвергались воздействию ДМСО или куркумина в течение 7

дней после трансдукции. Эффекты «глушения» подтвердились ОТ-ПЦР и иммуноблоттингом.

ОТ-ПЦР (метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией)

Цитоплазменная РНК фракционировалась в соответствии с нашими прежними процедурами (Feng et al. 2015; Ma et al. 2007) и экстрагировалась с помощью GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Один микрограмм цитоплазменной РНК включался в реакцию с обратной транскрипцией (10 мкл). ПЦР проводился 26-30 циклами.

Последовательности (5'3') пар праймеров были следующими (для каждого гена прямой праймер указан первым, за ним обратный праймер): SMN2: AAG ACT GGG ACC AGG AAA GC, TAT CTT CTA TAA CGC TTC ACA TTC CAG; SRSF1: CCT CCA GAC ATC CGA ACC AAG, TGC TAC GGC TTC TGC TAC GAC; hnRNP A1: GTC TAA GTC AGA GTC TCC TAA AGA GCC, TCT CAT TAC CAC ACA GTC CGT G; SAM68: GCT GAC GGC AGA AAT TGA GAA G, TTG ACA GGT ATC AGC ACT CGC TC; GAPDH: GTC AAC GGA TTT GGT CGT ATT G, AAC CAT GTA GTT GAG GTC AAT GAA G.

Продукты ПЦР растворялись в 2-3%-ном агарозном геле с 0,5 мкг/мл этидиум бромида. Гели представлены на рисунках перевернутые цифровые изображения. Количество сплайс-вариантов SMN2_E7+ представлено в виде молярного процентного содержания относительно общего количества вариантов SMN2 (E7+ и E7-).

Вестерн-блоттинг

Клетки трижды промывались охлажденным натрий-фосфатным буфером (PBS), собирались скребками, осаждались центрифугированием при 14 000 об./мин. в течение 30 сек. при 40°C и лизировались в RIPA-буфере (2 mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄ и 10 mM NaF) (Feng et al. 2015). Количественное определение белка проводилось по методу Бредфорда; образцы обрабатывались 10 или 12%-ными трицин-акриламидовыми гелями и затем помещались на поливинилиденфторидовые мембраны. Затем мембраны блокировались в 5%-ном сухом молоке и пробирывались следующими мышиными антителами, все из которых были приобретены у Santa-Cruz Biotechnology, если не указано другое: анти-SMN (H-7, 1:400), анти-SRSF1

(клон 96, 1:500), анти-мшРНК А1 (9Н10, 1:1000), анти-SAM68 (7-1, 1:250), анти-нуклеолин (Н-6, 1:1000), анти-б-актин (С4, 1:1000) и анти-глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (Sigma, 1G5, 1:2000). После инкубации с пероксидаза-конъюгированным козьим анти-мышиним иммуноглобулином с вторичными антителами М или G (Sigma-Aldrich, 1:2000), белки визуализировались с помощью усиленной хемилюминесценции (GE Healthcare). Денситометрия полученных полос анализировалась на Image J (разработка НИЗ США, U.S. National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Иммуноокрашивание

Фибробласты VJ301J помещались на плашки, обрабатывались ДМСО или куркумином в течение 24 часов, дважды промывались в охлажденном натрий-фосфатном буфере (PBS) с 1% БСА, фиксировались в 4%-ном параформальдегиде (ПФА) в течение 15 минут и затем пермеабелизовались 0,2% Triton X-100 в течение 10 минут при комнатной температуре. Фиксированные клетки инкубировали в течение ночи при 40С мышинными моноклональными антителами анти-SRSF1, анти-мшРНК А1 и анти-Sam68, соответственно. Первичные антитела растворялись в TBS в соотношении 1:100 20 mM TrisCl, 500 mM NaCl) с 1% БСА. Затем клетки дважды промывались TBS и инкубировались с козьими антимышиными флуоресцентными вторичными антителами (конъюгированными с флуоресцеинизотиоцианатом, FITC, в соотношении 1:1000) в темном месте в течение 1 часа при комнатной температуре. Клетки затем контр-окрашивались диамино-4',6-2-фенилиндолом, DAPI (1:6000). Окрашенные клетки затем закреплялись (Sigma-Aldrich). Фото делались с 100-кратным увеличением с помощью микроскопа Olympus.

Фракционирование ядерных и цитоплазматических белков

Фибробласты VJ301J трижды промывались в охлажденном PBS в чашках и затем отбирались резиновыми скребками в 1 мл охлажденного PBS. Осажденные клетки затем собирались в 1,5-мл трубки центрифугированием при 14 000 об./мин. d

течение 30 сек. и затем повторно суспендировались в охлажденном буфере NP-40 с 2 mM PMSF, 2 mM Na3VO4 и 10 mM NaF. После центрифугирования при 14 000 об./мин. в течение 2 мин. супернатант использовался в качестве цитоплазматической фракции посредством дополнительного центрифугирования при 14 000 об./мин., сахарозная подушка 24% (w/v). Осажденные ядерные белки дважды промывались в 1 мл охлажденном буфере NP-40 перед повторным суспендированием в буфере RIPA с 2 mM PMSF, 2 mM Na3VO4 и 10 mM NaF. После обработки ультразвуком они использовались в качестве ядерной фракции.

Иммунопреципитация и анализ фосфатазы

Фибробласты VJ301J трижды промывались в охлажденном PBS. Цитоплазматические и ядерные лизаты подготавливались согласно протоколу, описанному в разделе «Фракционирование цитоплазмы и ядер». Гранулы белка G пять раз промывались охлажденным PBS, затем паковались с 2 мкг антитела анти-SRSF1 и инкубировались при 40С с вращением в течение 4 часов. После промывания холодным PBS упакованные гранулы белка G инкубировались в течение ночи с лизатами при 40С. По истечении времени инкубирования супернатант удалялся центрифугированием, а гранулы трижды промывались в лизисном буфере для последующего анализа.

Осаждение проводилось в 19-реакционном буфере с 10 единицами CIAP, инкубация при 370С в течение 60 мин. После этого осажденные частицы смешивались с 69 SDS нагрузочным буфером, нагревались при 950С в течение 5 минут для денатурации белков и их отделения от гранул белка G, а супернатант использовался в вестерн-блоттинге.

Статистический анализ

Данные анализировались по двустороннему критерию Стюдента. Значения $p < 0,05$ признаны статистически значимыми.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Balasubramanyam K et al (2004) Curcumin, a novel p300/CREBbinding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *J Biol Chem* 279(49):5116351171
2. Bialojan C, Takai A (1988) Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J* 256(1):283290
3. Burghes AH, Beattie CE (2009) Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci* 10(8):597609
4. Burnett BG et al (2009) Regulation of SMN protein stability. *Mol Cell Biol* 29(5):11071115
5. Cartegni L, Krainer AR (2002) Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 30(4):377384
6. Cartegni L et al (2006) Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2. *Am J Hum Genet* 78(1):6377
7. Chen HH et al (2008) The RNA binding protein hnRNP Q modulates the utilization of exon 7 in the survival motor neuron 2 (SMN2) gene. *Mol Cell Biol* 28(22):69296938
8. Coovert DD et al (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 6(8):12051214
9. Darvesh AS et al (2012) Curcumin and neurodegenerative diseases: a perspective. *Expert Opin Investig Drugs* 21(8):11231140
10. Dayangac-Erden D et al (2011) Carboxylic acid derivatives of histone deacetylase inhibitors induce full length SMN2 transcripts: a promising target for spinal muscular atrophy therapeutics. *Arch Med Sci* 7(2):230234
11. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA (2007) Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 5(10):981989
12. Feng D et al (2015) Increase of a group of PTC(?) transcripts by curcumin through inhibition of the NMD pathway. *Biochim Biophys Acta* 1849(8):11041115
13. Glozak MA, Seto E (2007) Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 26(37):54205432
14. Gupta SC et al (2012) Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39(3):283299
15. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB (2013) Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J* 15(1):195218
16. Han X et al (2012) Curcumin inhibits protein phosphatases 2A and 5, leading to activation of mitogen-activated protein kinases and death in tumor cells. *Carcinogenesis* 33(4):868875
17. Hnilicova J et al (2011) Histone deacetylase activity modulates alternative splicing. *PLoS One* 6(2):e16727
18. Hsieh-Li HM et al (2000) A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 24(1):6670
19. Hua Y et al (2010) Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev* 24(15):16341644
20. Kashima T, Manley JL (2003) A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 34(4):460463
21. Kashima T et al (2007) hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum Mol Genet* 16(24):31493159
22. Lefebvre S et al (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80(1):155165
23. Liu G et al (2012) A conserved serine of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (hnRNP L) mediates depolarization-regulated alternative splicing of potassium channels. *J Biol Chem* 287(27):2270922716
24. Lorson CL et al (1998) SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 19(1):6366
25. Ma S et al (2007) Relocalization of the polypyrimidine tract-binding protein during PKA-induced neurite growth. *Biochim Biophys Acta* 1773(6):912923
26. Monani UR (2005) Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron* 48(6):885896
27. Monani UR et al (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9(3):333339
28. Ngo JC et al (2005) Interplay between SRPK and Clk/Sty kinases in phosphorylation of the splicing factor ASF/SF2 is regulated by a docking motif in ASF/SF2. *Mol Cell* 20(1):7789
29. Novoyatleva T et al (2008) Protein phosphatase 1 binds to the RNA recognition motif of several splicing factors and regulates alternative pre-mRNA processing.

Hum Mol Genet 17(1):5270

30. Pedrotti S et al (2010) The splicing regulator Sam68 binds to a novel exonic splicing silencer and functions in SMN2 alternative splicing in spinal muscular atrophy. EMBO J 29(7):12351247

31. Sakla MS, Lorson CL (2008) Induction of full-length survival motor neuron by polyphenol botanical compounds. Hum Genet 122(6):635643

32. Shishodia S (2013) Molecular mechanisms of curcumin action: gene expression. BioFactors 39(1):3755

33. Shishodia S, Singh T, Chaturvedi MM (2007) Modulation of transcription factors by curcumin. Adv Exp Med Biol 595:127148

34. Singh NK et al (2006) Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron. Mol Cell Biol

26(4):13331346

35. Swoboda KJ et al (2005) Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function. Ann Neurol 57(5):704712

36. Wirth B et al (2006) Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. Hum Genet 119(4):422428

37. Yu J et al (2009) The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L is an essential component in the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV-regulated alternative splicing through cytidine-adenosine repeats. J Biol Chem 284(3):15051513

38. Zhang Z et al (2008) SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. Cell 133(4):585600