

Функциональный анализ мутаций в гене фактора транскрипции PDX-1, связанных с разными формами сахарного диабета

Научный руководитель – Рубцов Петр Михайлович

Якубенко Д.А.¹, Мельникова А.И.²

1 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: yakubenko.da@phystech.edu*; 2 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: anyakuznetsova5@mail.ru*

Ген PDX-1 (Pancreas duodenum homeobox-1) кодирует фактор транскрипции, необходимый для развития и регенерации β -клеток поджелудочной железы [3, 4]. PDX-1 содержит ДНК-связывающий домен (Homeodomain), расположенный ближе к С-концу белка, и домен трансактивации. Мутации в гене приводят к развитию разных форм сахарного диабета [5]. PDX-1 взаимодействует с другими факторами транскрипции [2, 4] и необходим для активации промоторов инсулина, глюкокиназы и амилоидного полипептида. Цель настоящей работы - изучение влияния мутаций в гене PDX-1, выявленных у больных диабетом, на транскрипционную активность этого белка.

Выбор миссенс-мутаций для функциональных исследований проводили на основе анализа базы данных Human Gene Mutation Database (HGMD) [5]. Перечень выбранных замен аминокислот включает C18R, P33T, Q59L, L73P, D76N, P87L, A152G, R155S, E164D, Y170H, R176Q, E178K, E178G, E178A, R197H, G2132R, E244K, P239Q. Для экспрессии белка дикого типа использовали плазмиду на основе вектора pCDNA3.1(+) со встроенной под контроль промотора цитомегаловируса кДНК PDX-1. Замены нуклеотидов, соответствующие миссенс-мутациям, идентифицированным у больных разными формами диабета, вводили, используя олигонуклеотид-направленный мутагенез. Для определения транскрипционной активности PDX-1 дикого типа и мутантных вариантов использовали репортерные конструкции, содержащие ген люциферазы светлячка под контролем промоторов генов инсулина и глюкокиназы человека. Проводили котрансфекцию клеток НЕК293 плазмидами, обеспечивающими экспрессию вариантов PDX-1, и репортерными плазмидами. Через 48 часов определяли активность люциферазы, по которой судили о транскрипционной активности исследуемых вариантов PDX-1. Полученные результаты сопоставляли с предсказаниями компьютерной программы PolyPhen-2 [1] и известными клиническими данными. Проводится анализ соответствия между снижением транскрипционной активности PDX-1 по сравнению с диким типом и тяжестью клинических проявлений мутаций.

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (проекты №18-04-01271 и №17-29-06049).

Источники и литература

- 1) Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L. A method and server for predicting damaging missense mutations // Nat Methods. 2010; 7(4):248-249.
- 2) Juliana C.A., Yang J., Corey E., Cannon C.E. A PDX1-ATF Transcriptional Complex Governs β Cell Survival During Stress // Mol Metab. 2018; 17, 39-48.
- 3) Wang X., Michael Sterr M. Point Mutations in the PDX1 Transactivation Domain Impair Human β -Cell Development and Function // Mol Metab. 2019; 24, 80-97.
- 4) Zhu Y. Liu Q., Zhou Z., Yasuhiro Ikeda Y. PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: Critical Transcription Regulators for Beta Cell Development and Regeneration // Stem Cell Res Ther; 2017; 8 (1), 240.
- 5) Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/>