

Исследование механизмов сигнализации через неклассический каннабиноидный рецептор GPR55 с помощью системы CRISPR/Cas9

Научный руководитель – Серова Оксана Викторовна

Дегтярева Ксения Олеговна

Студент (специалист)

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
Москва, Россия

E-mail: degtyarevak99@gmail.com

Серова О.В., Акимов М.Г., Дудина П.В., Шерстяных Г. Д., Деев И.Е., Петренко А.Г., Безуглов В.В.

Институт биоорганической химии. им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,
Москва.

GPR55- неклассический каннабиноидный рецептор, сопряженный с G-белком. Это мультилигандный рецептор. В зависимости от структуры лиганда его активация будет вызывать разный ответ со стороны клетки. Например его активация лизофосфатидилинозитом, который обычно присутствует в большой концентрации в опухолях, стимулирует пролиферацию опухолевых клеток. Поэтому высокий уровень экспрессии данного белка в опухолях является маркером плохого прогноза развития заболевания[2][3]. Однако взаимодействие GPR55 с анандамидом и различными ацилдофаминами приводит к индукции клеточной смерти по пути апоптоза[1]. Механизм, который приводит к переключению вида активности этого рецептора, не установлен, однако он может быть связан с формированием димеров между GPR55 и каннабиноидными рецепторами CB1 и CB2. Для проверки этой гипотезы были получены нокаутные по GPR55 и CB2 клеточные линии.

В качестве объекта для экспериментов выбрали клеточную линию MDA-MB-231 (опухоль молочной железы), где был зафиксирован значимый уровень экспрессии GPR55 и CB2. Клетки трансфицировали с помощью вектора PX459, в который клонированы участки целевых генов, далее проводили селекцию с использованием пурамицина. Выжившие в результате селекции клетки были расклонированы. Из клонов выделили геномную ДНК и с помощью ПЦР наработали участок, куда были внесены изменения. ПЦР-фрагменты заклонировали в T-вектор. Секвенирование подтвердило наличие делеций в генах, кодирующих GPR55 и CB2 во всех аллелях клеток различных клонов. Данные изменения приводили к сдвигу рамки считывания таким образом, что модифицированные CRISPR/Cas9 гены более не кодировали функциональный белок. Для оценки действия вызывающих апоптоз лигандов GPR55 (дофаминамид докозогексаеновой кислоты (DHA-DA)) на нокаутные линии был использован МТТ-тест. С помощью серии МТТ-тестов было установлено, что при обработке лигандом GRR55 (DHA-DA) клеток с нокаутом CB2 их выживаемость достоверно снижалась по сравнению с обычными MDA-MB-231. Это позволяет сделать предположение о том, что CB2 противодействует сигналу GPR55.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 19-04-00302, 19-04-01042, 19-04-00815

Источники и литература

- 1) Akimov, M.G., Ashba, A.M., Gretskaia, N.M. et al. N-acyl dopamines induce apoptosis in PC12 cell line via the GPR55 receptor activation. Dokl Biochem Biophys 474, 155–158 (2017).

- 2) Andradas C.et al. Activation of the orphan receptor GPR55 by lysophosphatidylinositol promotes metastasis in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Jul 26;7(30):47565-47575
- 3) Falasca M, Ferro R. Role of the lysophosphatidylinositol/GPR55 axis in cancer. *Adv Biol Regul*. 2016 Jan;60:88-93.