

Альтернативные и мутантные варианты фактора транскрипции PAX4 человека: сравнение транскрипционной активности

Научный руководитель – Рубцов Петр Михайлович

Кузнецова Анна Ивановна

Студент (магистр)

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: anyakuznetsova5@mail.ru

Дифференцировка инсулин-продуцирующих β -клеток в ходе развития поджелудочной железы и их нормальное функционирование в течение всей жизни регулируются с участием нескольких специфических факторов транскрипции. Среди них важнейшую роль играет фактор транскрипции семейства Paired-box - PAX4. PAX4 содержит два ДНК-связывающих домена - домен Paired-box и гомеодомен. Существует несколько изоформ PAX4 человека, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга. Целью настоящей работы было сравнение свойств разных изоформ фактора транскрипции PAX4 человека и изучение влияния мутаций в гене PAX4, выявленных у больных диабетом MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young) [1], на транскрипционную активность этого фактора. Для синтеза кДНК PAX4 использовали суммарную РНК из плаценты человека. Анализ клонированных кДНК показал, что наряду с полной формой кДНК, присутствуют образованные в результате альтернативного сплайсинга варианты, которые содержат полный домен Paired, но лишены части гомеодомена. Для экспрессии полученных кДНК в клетках млекопитающих их клонировали в векторе pCDNA3.1(+). Для получения мутантных вариантов PAX4 использовали метод двухраундовой ПЦР с мутагенными праймерами. Наряду с изученными ранее вариантами PAX4 с заменами аминокислот R121W и R164W, получили варианты с заменами аминокислот R19W, D126G, R183C, T199I, G235V, C282R и A330V, не описанные ранее. Для анализа промоторной активности вариантов PAX4 использовали репортерную систему - плазмиду с геном люциферазы, встроенным под контроль промотора гена инсулина человека, сконструированную на основе вектора pGL4.10[luc2]. Через 48 часов после котрансфекции клетки HEK293 лизировали и определяли люминесценцию клеточных лизатов. В использованной системе природная полноразмерная изоформа PAX4, содержащая оба интактных ДНК-связывающих домена, максимально повышала активность инсулинового промотора, тогда как формы с неполным гомеодоменом проявляли меньшую активность. Транскрипционная активность вариантов с заменами аминокислот в домене Paired (R19W и R121W) и гомеодомене (R164W и R183C) была статистически значимо снижена по сравнению с активностью белка дикого типа, тогда как изменения активности вариантов с заменами аминокислот в междоменных участках были статистически незначимы.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №17-29-06049 и №18-04-01271).

Источники и литература

- 1) Vaxillaire M. Monogenic diabetes of the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes // *Endocr. Rev* 2008. V. 29. P. 254-264.
- 2) Shimajiri Y. A missense mutation of Pax4 Gene (R121W) is associated with Type 2 Diabetes in Japanese // *Diabetes* 2001. V. 50. P. 2864-2869.
- 3) Plengvidhya N. PAX4 Mutations in Thais with Maturity Onset Diabetes of the Young // *Endocrinol. Metabolism* 2007. V. 92. P. 2821-2826.