

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-258

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ И МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ PAX4, СВЯЗАННЫХ С МОНОГЕННЫМ ДИАБЕТОМ MODY9***COMPARATIVE ACTIVITY OF ALTERNATIVE AND MUTANT VARIANTS OF THE PAX4 TRANSCRIPTION FACTOR ASSOCIATED WITH MONOGENIC DIABETES MODY9**А. И. Мельникова^{1,2}, Т. С. Краснова¹, П. М. Рубцов¹¹*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва*²*Московский физико-технический институт, Долгопрудный*A. I. Melnikova^{1,2}, T. S. Krasnova¹, P. M. Rubtsov¹¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow*²*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny*

✉ anyakuznetsova5@mail.ru

Аннотация

В настоящее время фактор транскрипции PAX4 рассматривается как один из ключевых элементов в разработке новых методов лечения сахарного диабета. В данной работе суммированы результаты исследования альтернативных и мутантных вариантов данного гена.

Abstract

The PAX4 transcription factor is considered as one of the key elements in the development of new treatments for diabetes mellitus. This paper summarizes the results of the study of the alternative and mutant variants of this gene.

PAX4 — фактор транскрипции, участвующий в развитии инсулин-продуцирующих β-клеток поджелудочной железы на стадии эмбрионального развития и обеспечивающий их пластичность уже в зрелом возрасте. Мутации в гене PAX4 приводят к диабету типа MODY. Способность фактора активировать пути пролиферации и защищать клетки от апоптоза указывает на него как на один из ключевых элементов в разработке новых методов лечения сахарного диабета, направленных на регенерацию эндогенной массы β-клеток [1]. N-конец белка PAX4 отвечает за связывание с ДНК, С-конец характеризуется наличием трансактиваторного домена и домена с отрицательной регуляцией, наделяющий PAX4 функцией репрессора транскрипции [2]. Существует несколько изоформ PAX4, отличающихся друг от друга N- и С-концевой областью и по-разному влияющих на активность инсулинового и глюкагонового промоторов. У пациентов с MODY9 ранее были обнаружены мутации R121W и R164W в гене PAX4, влияющие на его активность. Замена аминокислоты в ДНК-связывающем домене приводит к изменению его структуры, и мутантные варианты PAX4 выступают в качестве репрессора транскрипции [3, 4]. При секвенировании гена PAX4 у больных с симптомами MODY был обнаружен ряд новых мутаций R19W, D126G, R183C, T199I, G235V, C282R и A330V, которые попадают в различные области гена, тем самым могут проявлять различные функции. Цель данной работы — охарактеризовать альтернативные варианты гена PAX4 дикого типа, исследовать влияние новых мутаций на активность промоторов инсулина и глюкагона человека, а также оценить влияние мутантных вариантов на жизнеспособность клеток в условиях гипергликемического стресса.

Было показано, что С-концевая область PAX4 определяет его функцию в зависимости от типа клеток [5]. Мы получили восемь альтернативных вариантов кДНК PAX4 дикого типа. Они отличаются в участках, кодирующих С-конец, наличием или отсутствием первого экзона, а также полным или усеченным гомеодоменом. С помощью конструкции, содержащей репортерный ген люциферазы под контролем инсулинового промотора, показано, что в клетках НЕК293 изоформы PAX4, содержащие первый экзон, имеют значительно более высокую активность по сравнению с соответствующими вариантами, лишенными первого экзона. Установлено, что альтернативные варианты PAX4 дикого типа имеют более низкую активность на промоторах гена инсулина и глюкагона человека по сравнению с канонической формой. Кроме того, изоформа PAX4 дикого типа с делецией одного экзона проявляет доминантное действие и нарушает транслокацию белка в клеточное ядро.

* Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 124031800074-4).

В промоторной области гена PAX4 существуют два высоко аффинных сайта связывания собственного гена, через которые он оказывает сильное негативное ауторегуляторное действие [6]. Мы получили конструкции, содержащие этот участок. Они будут использованы для дальнейшего анализа.

Большинство исследуемых мутаций R19W, D126G, R183C, T199I, G235V, C282R, A330V в гене PAX4 имеют более низкую активность на промоторе инсулина по сравнению с диким типом в клетках HEK293. Кроме того, такие мутации, как R19W, R121W, R164W и R183C, попадающие в консервативные ДНК-связывающие домены, снижают активность инсулинового промотора сильнее, чем остальные, однако не проявляют сильного доминантно-негативного действия. Мутантные варианты PAX4, такие как R121W, D126G, R164W, R183C, G235V, не препятствуют транслокации белка в ядро в клетках HEK293. С помощью метода ХТТ было показано, что в клетках крысиной инсулиномы INS-1E сверхэкспрессия PAX4 дикого типа увеличивает жизнеспособность клеток при обработке их высокой глюкозой (40мМ), в то время как экспрессия мутантных вариантов R19W и R121W значительно снижает жизнеспособность клеток в условиях стресса.

Литература

1. Lorenco P. et al. Therapeutic potential of pancreatic PAX4-regulated pathways in treating diabetes mellitus // *Current Opinion in Pharmacology*. 2018. Vol. 43. P. 1–10.
2. Lorenzo P. et al. The Diabetes-Linked Transcription Factor PAX4: From gene to functional consequences // *Genes*. 2017. Vol. 8. P. 101.
3. Shimajiri Y. et al. A missense mutation of Pax4 Gene (R121W) is associated with Type 2 Diabetes in Japanese // *Diabetes*. 2001. Vol. 50.
4. Plengvidhya N. et al. PAX4 Mutations in Thais with Maturity Onset Diabetes of the Young // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007. Vol. 92. P. 7.
5. Fujitani Y. et al. Identification of a Portable Repression Domain and an E1A-Responsive Activation Domain in Pax4: a Possible Role of Pax4 as a Transcriptional Repressor in the Pancreas // *Molecular and Cellular Biology*. 1999. Vol. 19. P. 12.
6. Smith S.B. et al. Autoregulation and maturity onset diabetes of the young transcription factors control the human PAX4 promoter // *Journal of Biological Chemistry*. 2000. Vol. 275. P. 36910–36919.