

Разработка репортерной клеточной линии для изучения инсулиновой сигнализации в реальном времени.

Федоровский Александр Платонович

Студент (специалист)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Кафедра биологической и медицинской химии, Москва, Россия

E-mail: alex.fedorovsky03@mail.ru

Согласно данным ВОЗ за последние 40 лет заболеваемость сахарным диабетом (СД) возросла в 4 раза. В 2019 году СД стал девятой причиной смерти в мире, в этом году из-за данного заболевания умерло приблизительно 1,5 миллиона человек. СД является одной из самых распространённых причин почечной недостаточности, инсульта, атеросклероза, артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, слепоты. Инсулинорезистентность (ИР), являющаяся риск-фактором развития СД 2 типа, также способствует канцерогенезу, ожирению, различным сердечно-сосудистым патологиям. На данный момент механизмы возникновения ИР полностью не выяснены. Учитывая фундаментальное значение ИР в патогенезе многих заболеваний, задача раскрытия механизмов возникновения ИР имеет важное значение для медицины. Одним из возможных подходов для изучения инсулиновой сигнализации является использование клеточных линий.

Целью исследования является создание модели для изучения инсулиновой чувствительности клеток в реальном времени.

Тирозинкиназа Брутона (ВТК) - нерецепторная тирозинкиназа, принимающая участие в созревании и функционировании В-лимфоцитов. В состав ВТК входит домен плекстриновой гомологии (РН-домен), имеющий сродство к фосфатидилинозитол (3,4,5)-трисфосфату (PIP₃). PIP₃, продуцируемый PI3K, является важным интермедиатом инсулинового сигнального каскада. ВТК не влияет на чувствительность клеток к инсулину. Это обстоятельство позволяет использовать ВТК в качестве сенсора инсулиновой сигнализации для мезенхимных стромальных клеток (МСК). В ходе исследований данной клеточной линии выяснилось, что генетическая конструкция ВТК-GFP, выступая как конкурентный ингибитор PI3K сигнального каскада за счёт связывания с PIP₃, ослабляет адипогенную и усиливает остеогенную дифференцировку МСК.

С помощью генно-инженерных методов мы создали плазмиду, содержащую ген, состоящий из GFP и РН-домена ВТК. Затем была проведена трансдукция иммортализованных МСК (hTERT МСК) с помощью лентивирусных частиц, содержащих целевую плазмиду. В «состоянии покоя» наибольшая интенсивность флуоресценции наблюдалась в околядерных областях клетки. При развитии инсулинового сигнального каскада ВТК-GFP связывается с образующимся PIP₃, закориваясь в примембранном пространстве, при этом наблюдается более диффузный характер свечения. Видимые различия во флуоресцентной картине между «состоянием покоя» и состоянием стимуляции инсулином позволяют говорить о том, что ВТК-GFP является перспективным сенсором инсулиновой чувствительности. Подобная модель является незаменимым инструментом для изучения механизмов развития ИР и поисков способов её коррекции.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (Грант № 20-015-00508, Клеточные механизмы регуляции гормональной чувствительности и дифференцировки стволовых клеток, роль регуляторных субпопуляций).