

Создание модельной системы для исследования интерактома альфа-синуклеина в патогенезе болезни Паркинсона

Научный руководитель – Медведев Сергей Петрович

Шарипова Динара Витальевна

Студент (магистр)

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

E-mail: dinarizazhiya@yandex.ru

Болезнь Паркинсона (БП) - одно из самых распространенных нейродегенеративных расстройств. Оно относится к протеинопатиям, то есть в основе патологического процесса лежит нарушение структуры определенного белка. Этим белком является альфа-синуклеин: он формирует внутриклеточные агрегаты (тельца Леви) в ходе развития болезни. Несмотря на систематические исследования, до сих пор доподлинно неизвестен конкретный механизм патологического действия альфа-синуклеина на жизнеспособность нейронов головного мозга, а также закономерности формирования и конкретный состав телец Леви. Для обеспечения прогресса в данном направлении, необходима разработка экспериментальных систем, которые предназначены для выяснения паттерна взаимодействия альфа-синуклеина с различными белками и структурами в нейронах человека.

Цель работы - создание клеточной платформы, предназначенной для изучения межмолекулярных взаимодействий альфа-синуклеина. Для исследования были получены мононуклеары крови 50-ти пациентов, страдающих БП, для каждого из них было проведено секвенирование экзона. Клетки одного пациента, имеющего патологическую мутацию, связанную с развитием БП, были выбраны для дальнейшей работы.

В ходе работы был разработан протокол получения пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с помощью эписомного репрограммирования. У полученных линий ИПСК был подтвержден их плюрипотентный статус. Генно-инженерными методами были собраны плазмидные конструкции, предназначенные для изучения интерактома альфа-синуклеина *in vitro*. Эти конструкции кодируют ген альфа-синуклеина с двумя вариантами эпитопов на N- или C-конце будущего белка: 3xFLAG или 3xFLAG + 2xStrep-Tag II (всего 4 конструкции). Встройка трансгена будет осуществляться с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 в локус *AAVS1*. Уже подобран способ и условия трансфекции, необходимые для получения трансгенных линий клеток; получены предварительные клеточные клоны, ведется их анализ. Также, работоспособность предложенной системы подтверждена на клетках линии НЕК293А с помощью вестерн-блот анализа.

Полученные в работе пациент-специфичные ИПСК, несущие трансген (альфа-синуклеин+эпитоп) будут использованы для изучения интерактома альфа-синуклеина: спектр взаимодействий этого белка будет исследован методами коиммунопреципитации, вестерн-блота, масс-спектрофотометрии и FRET-анализа. С помощью этой модельной системы будут выявлены молекулярные и генетические механизмы развития БП и других синуклеинопатий. Также, с помощью нее можно будет обнаружить мишени для разработки новых лекарственных препаратов, предотвращающих или замедляющих прогрессию БП.