

Создание клеточных моделей для исследования стресса эндоплазматического ретикулума с помощью генетически кодируемых биосенсоров

Научный руководитель – Медведев Сергей Петрович

Тарасевич Денис Антонович

Студент (магистр)

Новосибирский государственный университет, Факультет естественных наук,
Новосибирск, Россия

E-mail: Denistarasevi4@yandex.ru

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) является ключевой органеллой для биосинтеза белков. Стресс ЭПР возникает при накоплении неправильно свернутых белков в просвете ЭПР, что приводит к нарушению синтеза и транспорта белков, и активации различных внутриклеточных сигнальных путей, таких как UPR (Unfolded Protein Response). UPR включает в себя три основных регуляторных мембранных белка: IRE1, ATF6 и PERK. Они запускают каскады реакций, которые приводят к общему понижению синтеза белка в клетке и повышению синтеза шаперонов и белков, участвующих в деградации неправильно свернутых белков.

Стресс ЭПР играет важную роль в патогенезе многих заболеваний, например, нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Паркинсона. Так, мутация в гене *GBA1* приводит к дисфункции лизосомального фермента глюкоцереброзидазы, которая приводит к накоплению олигомеров белка α -синуклеина и апоптотической гибели дофаминергических нейронов.

Существующие на данный момент методы исследования стресса ЭПР и ответа на него включают в себя определение уровней маркеров стресса ЭПР с помощью кПЦР, иммунофлюоресценции, Вестерн-блот анализа. Однако эти методы предполагают фиксацию или лизирование клеток. Использование генетически кодируемых биосенсоров позволяет проводить мониторинг активации стресса ЭПР прижизненно, в реальном времени.

В ходе данной работы были созданы генетически кодируемые биосенсоры двух путей UPR: IRE1-XBP1 и ATF6. Биосенсор XBP1-TagRFP основан на активации белка XBP1 путём сплайсирования его мРНК белком IRE1. Биосенсор TagGFP2-ATF6 основан на релокации белка ATF6 из ЭПР в ядро клетки.

Далее были созданы и охарактеризованы линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с биосенсором XBP1-TagRFP на основе линии ИПСК PD30-4-7, полученной от пациента с болезнью Паркинсона с мутацией в гене *GBA1* с.1226A>G (p.N370S, rs76763715). Его интеграция производилась с помощью CRISPR/Cas9 опосредованной гомологичной рекомбинации в “safe harbor” локус *AAVS1*.

Также были созданы плазмидные конструкции с системой “Sleeping Beauty”, несущие последовательности, кодирующие белки джигантин и ламин Б, меченные флюоресцентными белками. Данные конструкции использовались для исследования колокализации второго биосенсора TagGFP2-ATF6 с комплексом Гольджи и ядром в клетках линии НЕК293, чтобы доказать, что биосенсор действительно может переходить в ядро клетки.

Нами планируется интегрировать биосенсор TagGFP2-ATF6 в линию ИПСК с биосенсором XBP1-TagRFP. Полученные клеточные линии могут быть использованы как в фундаментальных исследованиях функционирования системы UPR в клетках, в частности, в исследовании патогенеза болезни Паркинсона, так и для поиска низкомолекулярных молекул, которые могут влиять на эту систему.