

ПРИЛОЖЕНИЕ

СТРОЙЛОВА И СОАВТ.

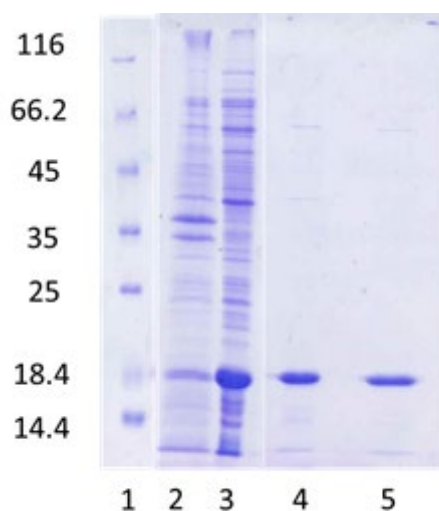


Рис. П1. Анализ препаратов альфа-синуклеина, выделенных после трансформации клеток *E. coli* плазмидой, несущей кодирующую последовательность гена *SNCA* с двумя стоп-кодонами ТААТАА, методом ДСН-электрофореза.

1 – Маркеры, 2 – клеточный осадок после обработки УЗ, 3 – супернатант после обработки УЗ, 4 – препарат альфа-синуклеина WT, обработанный β -меркаптоэтанолом, 5 – препарат альфа-синуклеина WT без обработки β -меркаптоэтанолом.

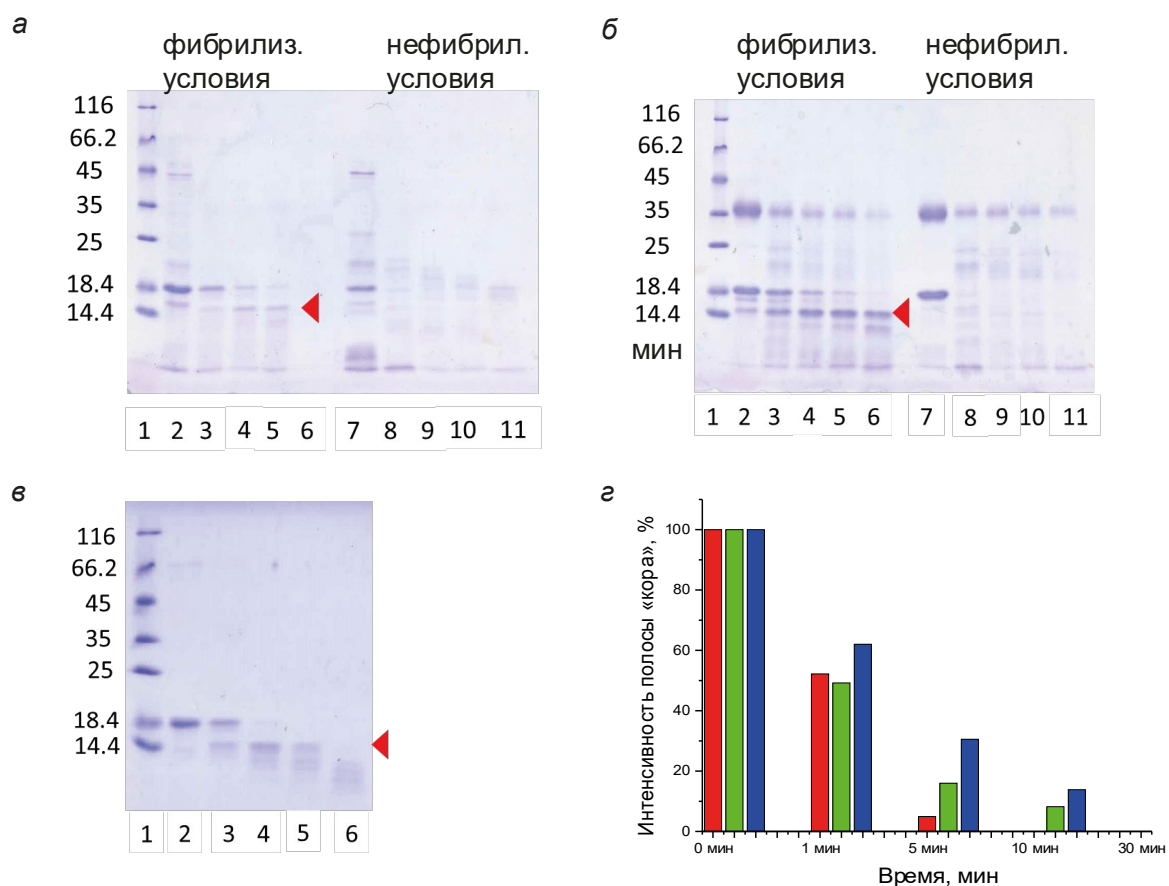


Рис. П2. Электрофоретический анализ проб после частичного расщепления фибрилл альфа-синуклеина, полученных в присутствии N-белка (а), RBD (б) или без их добавления (в). График интенсивности расщепляемых полос показан на рисунке г.

Красным треугольником показан «кор» фибрилл при расщеплении протеиназой К. На дорожки 2–6 нанесены препараты, полученные после 5 суток фибриллизации, 7–11 – через 5 суток в нефибриллизующих условиях. а: 1 – маркеры, 2 и 7 – исходный препарат альфа-синуклеина и N-белка, 3 и 8 – препарат альфа-синуклеина и N-белка после 1 минуты протеолиза, 4 и 9 – препарат альфа-синуклеина и N-белка после 5 минут протеолиза, 5 и 10 – препарат альфа-синуклеина и N-белка после 10 минут протеолиза, 6 и 11 – препарат альфа-синуклеина и N-белка после 30 минут протеолиза. б: 1 – маркеры, 2 и 7 – исходный препарат альфа-синуклеина и RBD, 3 и 8 – препарат альфа-синуклеина и RBD после 1 минуты протеолиза, 4 и 9 – препарат альфа-синуклеина и RBD после 5 минут протеолиза, 5 и 10 – препарат альфа-синуклеина и RBD после 10 минут протеолиза, 6 и 11 – препарат альфа-синуклеина и RBD после 30 минут протеолиза. в: 1 – маркеры, 2 – исходный препарат альфа-синуклеина, 3 – препарат альфа-синуклеина после 1 минуты протеолиза, 4 – препарат альфа-синуклеина после 5 минут протеолиза, 5 – препарат альфа-

синуклеина после 10 минут протеолиза, 6 – препарат альфа-синуклеина после 30 минут протеолиза. *г*: На графике показаны столбиками интенсивности полос, соответствующих «ядру» фибриллы через 0, 1, 5, 10 минут протеолиза. Красным цветом выделены столбцы для фибрилл альфа-синуклеина, зелёным – смесь альфа-синуклеина с N-белком, синим – смесь альфа-синуклеина с RBD.

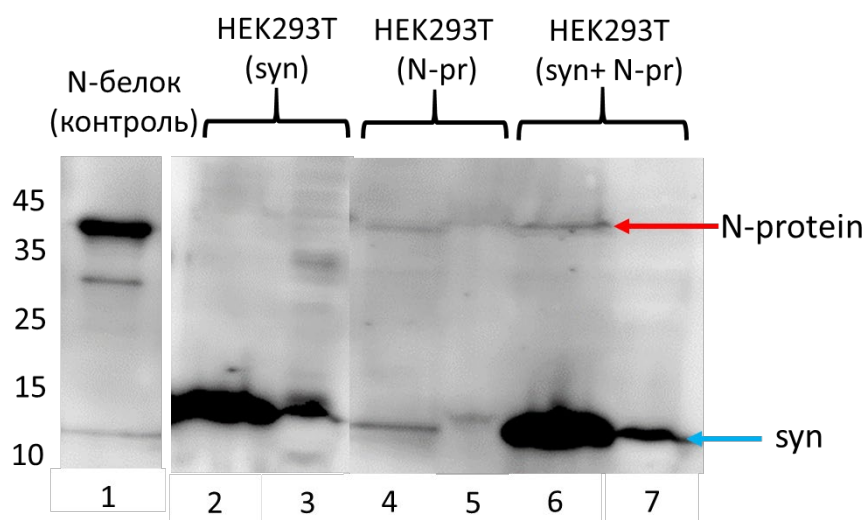


Рис. ПЗ. Вестерн-блот анализ лизатов клеток HEK293T после транзientной трансфекции плазмидами, кодирующими альфа-синуклеин и N-белок отдельно или совместно.

Изолированный N-белок (контроль) (дорожка 1), супернатант (2) и осадок (3) лизатов клеток HEK293T через 2 дня после трансфекции плазмидой, кодирующей альфа-синуклеин, супернатант (4) и осадок (5) лизатов клеток HEK293T через 2 дня после трансфекции плазмидой, кодирующей N-белок, супернатант (6) и осадок (7) лизатов клеток HEK293T – через 2 дня после трансфекции двумя плазмидами. Окраску антителами на альфа-синуклеин и N-белок проводили одновременно. Стрелками показаны исследуемые белки на мембране.

Пробоподготовка для масс-спектрометрического анализа. После проведения ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле белковые полосы разных форм альфа-синуклеина окрашивали Coomassie Brilliant Blue G-250, вырезали из геля (кусочки 2 × 2 мм) и дважды промывали 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0,02 М растворе NH_4HCO_3 в течение 20 мин при 37 °С для удаления красителя. Для обезвоживания гелей добавляли 200 мкл ацетонитрила, после удаления которого к образцам добавляли 5 мкл трипсина (12,5 нг/мл в 25 мМ NH_4HCO_3). Протеолиз проводили 4 часа при температуре 37 °С. Для экстракции пептидов к гелям добавляли 5 мкл 50%-ного

ацетонитрила, 0,5% ТФУ. На мишени-подложке смешивали 1 мкл полученного пептидного экстракта и 0,5 мкл раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты («Sigma-Aldrich», 40 мг/мл в 30%-ном водном ацетонитриле, 0,5% ТФУ).

Параметры определения флуоресценции на планшетном флуориметре CLARIOstar («BMG LABTECH GmbH», Германия): температура -37°C , фильтр возбуждения: 448 ± 5 нм, фильтр эмиссии: 482 ± 5 нм, усиление: 750, с орбитальным усреднением 2 мм, нижняя оптика, время установления: 1 с, кинетическое окно – 49 циклов, 12 вспышек на лунку и цикл, время цикла: 3600 с, орбитальное встряхивание, 700 об./мин, между циклами.