

© Коллектив авторов, 2025

УДК 577.25

Пукаева Н.Е.^{1,2}, Кухарская О.А.^{1,2}, Иванова Т.В.², Наздрачева М.Р.², Бурак М.В.², Попов А.А.²,
Овчинников Р.К.^{1,2}, Антохин А.И.², Московцев А.А.^{2,3}, Кухарский М.С.^{1,2}

Агрегация мутантной формы белка альфа-синуклеина α -Syn A53T в клетках нейронального типа SH-SY5Y: валидация модели

¹«Институт физиологически активных веществ» Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук, 142432, Московская область, Черноголовка, Северный проезд, д. 1;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 127994, Москва, ул. Островитянова, д. 1;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

Введение. Общим патогенетическим событием при развитии нейродегенеративных заболеваний является агрегация специфических белков в нервной системе. Агрегация белка α -синуклеина обнаруживается при болезни Паркинсона (БП), деменции с тельцами Леви, множественной системной атрофии и др. Исходя из этого, основным направлением поиска потенциальной терапии является разработка препаратов с антиагрегационными свойствами, которые способны предотвращать образование агрегатов, либо способствовать разрушению уже сформированных отложений, и таким образом, приостанавливать развитие патологического процесса. Для поиска и отбора таких препаратов необходимо использовать относительно простые и легко воспроизводимые тест-системы, в которых можно проверять их эффективность. Удобным инструментом для этих целей могут служить клеточные линии, экспрессирующие патогенные формы белков человека, связанные с развитием заболеваний. **Цель.** Получение и характеристика клеточной модели агрегации α -синуклеина человека на основе генетического конструктора с патогенной мутацией A53T, ассоциированной с семейной формой БП.

Методика. Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y трансфицировали плазмидным вектором, кодирующим α -синуклеин с мутацией A53T. Агрегацию белка стимулировали обработкой ингибитором протеасом MG132. Анализ проводили методом флуоресцентной и конфокальной микроскопии после иммуноцитохимического окрашивания белка в клетках. Для валидации модели была проведена оценка действия соединения – артемизинина, на развитие агрегации.

Результаты. Получена и охарактеризована модель агрегации α -синуклеина в клетках нейрональной линии человека, в которой воспроизводятся основные молекулярно-клеточные признаки характерные для синуклеинопатии. В клетках формировались белковые отложения нескольких морфологических типов, отражающих различные этапы агрегации. Ингибирование функции убиквитин-протеасомной системы приводило к значительному усилению агрегации и клеточной гибели. Соединение артемизинин, обладающее нейропротекторными свойствами, снижало общее число клеток с агрегатами, ингибируя накопление ранних продуктов агрегации.

Заключение. Полученная модельная система может быть использована для направленного поиска нейропротекторных препаратов, способных эффективно блокировать патологическую агрегацию α -синуклеина.

Ключевые слова: агрегация белков; альфа-синуклеин; синуклеинопатии; клеточная модель; нейродегенеративные заболевания; тестирование химических соединений; антиагрегационный эффект

Для цитирования: Пукаева Н.Е., Кухарская О.А., Иванова Т.В., Наздрачева М.Р., Бурак М.В., Попов А.А., Овчинников Р.К., Антохин А.И., Московцев А.А., Кухарский М.С. Агрегация мутантной формы белка альфа-синуклеина α -Syn A53T в клетках нейронального типа SH-SY5Y: валидация модели. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2025; 69(1): 29–41.

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.29-41

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Пукаева Н.Е., Кухарский М.С.; сбор и обработка материала – Кухарская О.А., Попов А.А.; подготовка иллюстративного материала – Наздрачева М.Р., Бурак М.В.; статистическая обработка материала – Иванова Т.В.; написание текста – Овчинников Р.К., Кухарский М.С.; редактирование – Московцев А.А., Антохин А.И., Кухарский М.С. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Для корреспонденции: Кухарский Михаил Сергеевич, e-mail: kukharskym@mail.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН 2024 года (тема № FFSG-2024-0023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 16.12.2024

Принята к печати 30.01.2025

Опубликована 27.03.2025

Pukaeva N.E.^{1,2}, Kukharskaya O.A.^{1,2}, Ivanova T.V.², Nazdracheva M.R.², Burak M.V.², Popov A.A.², Ovchinnikov R.K.^{1,2}, Antokhin A.I.², Moskovtsev A.A.^{2,3}, Kukharsky M.S.^{1,2}

Aggregation of the mutant alpha-synuclein protein (α -Syn A53T) in SH-SY5Y neuronal cells: model validation

¹Institute of Physiologically Active Compounds at Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Severnyu proezd, 1, Chernogolovka, 142432, Russian Federation;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovitianova Str. 1, Moscow 127994, Russian Federation;

³Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltijskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

Introduction. A common pathogenic event in the development of neurodegenerative diseases is the aggregation of specific proteins in the nervous system. The aggregation of α -synuclein protein is observed in Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy, and other disorders. Based on this, a key direction in the search for potential therapies is the development of anti-aggregation compounds that can prevent aggregate formation or promote the breakdown of existing deposits, thereby halting the progression of the pathological process. To identify and screen such compounds, relatively simple and reproducible test systems are required to assess their efficacy. Cell lines expressing pathogenic forms of human proteins associated with disease development serve as a convenient tool for these purposes.

Objective. To generate and characterize a cellular model of human α -synuclein aggregation based on a genetic construct carrying the pathogenic A53T mutation, which is associated with familial forms of PD.

Methods. Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were transfected with a plasmid vector encoding α -synuclein with the A53T mutation, associated with hereditary forms of PD. Protein aggregation was induced by treatment with the proteasome inhibitor MG132. The analysis was performed using fluorescence and confocal microscopy following immunocytochemical staining of the protein in cells. To validate the model, the effect of the neuroprotective compound artemisinin on aggregation dynamics was assessed.

Results. A model of α -synuclein aggregation was established and characterized in human neuronal cells, recapitulating key molecular and cellular features characteristic of synucleinopathies. Protein deposits of various morphological types were formed in the cells, reflecting different stages of aggregation. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system function led to a significant increase in aggregation and cell death. The compound artemisinin, known for its neuroprotective properties, reduced the overall number of cells with aggregates by inhibiting the accumulation of early aggregation products.

Conclusion. The developed model system can be utilized for targeted screening of neuroprotective drugs capable of effectively blocking pathological α -synuclein aggregation.

Keywords: protein aggregation; α -synuclein; synucleinopathies; cellular model; neurodegenerative diseases; compound screening; anti-aggregation effect

For citation: Pukaeva N.E., Kukharskaya O.A., Ivanova T.V., Nazdracheva M.R., Burak M.V., Popov A.A., Ovchinnikov R.K., Antokhin A.I., Moskovtsev A.A., Kukharsky M.S. Aggregation of the mutant alpha-synuclein protein (α -Syn A53T) in SH-SY5Y neuronal cells: model validation. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2025; 69(1): 29–41. (in Russian)

DOI: 10.48612/pfiet/0031-2991.2025.01.29-41

Author's contribution: concept and study design – Pukaeva N.E., Kukharsky M.S.; data collection and processing – Kukharskaya O.A., Popov A.A.; preparation of illustrative material – Nazdracheva M.R., Burak M.V.; statistical data analysis – Ivanova T.V.; manuscript writing – Ovchinnikov R.K., Kukharsky M.S.; editing – Moskovtsev A.A., Antokhin A.I., Kukharsky M.S. Final article approval and responsibility for the integrity of all sections – all co-authors.

For correspondence: **Michail S. Kukharsky**, Doctor Biol. Sc., Head of the Laboratory of Molecular-Genetic Mechanisms of Neurodegeneration, Institute of Physiologically Active Compounds, Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, e-mail: kukharskym@mail.ru

Information about the authors:

Pukaeva N.E., <https://orcid.org/0009-0004-4894-8068>

Kukharskaya O.A., <https://orcid.org/0000-0003-3015-6447>

Ovchinnikov R.K., <https://orcid.org/0009-0002-9426-4551>

Kukharsky M.S., <https://orcid.org/0000-0001-5080-2544>

Funding. This research was funded by the budget of the IPAC RAS State Target (№FFSG-2024-0023).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Received 16.12.2024

Accepted 30.01.2025

Published 27.03.2025

Введение

Альфа-синуклеин (α -synuclein) – небольшой (14 кДа) белок из 140 аминокислот, кодируемый геном *SNCA*, экспрессирующийся в нейронах центральной и периферической нервной системы, а также в клетках крови и других тканях [1, 2]. Долгое время считалось, что данный белок существует в клетках в «нативно развернутой» форме в виде мономера и приобретает свою устойчивую конформацию только при взаимодействии с мембраной везикул [3, 4]. Позднее было продемонстрировано, что эндогенный α -синуклеин в физиологических условиях представляет собой свернутый тетрамер с массой около 58 кДа, который не склонен, в отличие от мономера, образовывать амилоидоподобные агрегаты [5]. Дисбаланс в соотношении тетрамер/мономер может приводить к накоплению промежуточных олигомеров, далее зрелых фибрилл и развитию синуклеинопатий. Одной из форм синуклеинопатий является болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание [6]. В нервной системе пациентов с БП наблюдается накопление характерных отложений, содержащих α -синуклеин: в соме нейронов – телец Леви, в аксонах – нейритов Леви [7–10]. Генетические исследования показали, что миссенс-мутации (A18T, A29S, A30P, E46K, H50Q, G51D, A53T, A53E) в гене *SNCA* связаны с развитием семейных форм БП и деменции с тельцами Леви [11–14]. Мутация A53T – замена 53 аминокислоты с аланина на треонин, усиливает агрегационные свойства белка и способствует его токсическому действию на нервные клетки и синапсы [14–16].

Многочисленные исследования показали, что накопление α -синуклеина в мономерной или олигомерной форме может вызывать стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР-стресс) [17–19], что приводит к нарушению белкового гомеостаза (протеостаза) в клетке [20, 21]. В качестве дополнительных механизмов токсичности α -синуклеина выделяют нарушение везикулярного экзоцитоза и высвобождения нейротрансмиттеров [22–24], изменение динамики цитоскелета [25, 26], нарушение обмена кальция [27, 28], дисфункцию митохондрий [29–31], окислительный стресс [32] и т.д.

Убиквитин-протеасомная система (УПС) является основным путем деградации α -синуклеина в нормальных физиологических условиях [33], тогда как при накоплении аномальных форм белка она может быть уже не эффективна для его удаления из клетки и при этом подключается аутофаголизосомная система (АЛС) деградации [34]. Патологические формы α -синуклеина

нарушают функции УПС и АЛС и способствуют гибели нервных клеток [35, 36]. Экспрессия мутантного α -синуклеина A53T в дофаминергических клетках феохромоцитомы крысы PC12 вызывала снижение протеасомной активности и накопление в клетках аутофагосомных везикулярных структур [37]. Доставка мутантного α -синуклеина в черную субстанцию крыс с помощью аденоассоциированного вирусного вектора также приводила к нарушению каталитической функции 26S протеасомы, причем эти события предшествовали развитию клинических признаков заболевания [38]. Еще одним подтверждением важной роли систем поддержания белкового гомеостаза в клетке в патогенезе БП является тот факт, что мутации в генах, участвующих в работе УПС (*PRKN2*, *UCHL1*), ассоциированы с БП [39]. Нокдаун деубиквитиназы *USP9X* в клетках SH-SY5Y способствовал накоплению моноубиквитинированных форм α -синуклеина и усиливал образование токсичных включений α -синуклеина [40]. Таким образом, появление в клетке патогенных форм α -синуклеина с одной стороны, и нарушение функций систем деградации таких белков с другой стороны, способны взаимно усиливать друг друга и приводить к неуклонному прогрессированию нейродегенеративного процесса.

С тех пор, как была доказана ключевая роль α -синуклеина в развитии БП, ведутся активные работы по созданию клеточных и животных моделей, отражающих различные аспекты нарушения метаболизма этого белка, в которых проявляется его патологическая агрегация и токсическое действие на клетки. С помощью таких моделей за последние годы были значительно расширены представления о патогенезе БП [41–46]. Вместе с тем остаются не до конца понятны конкретные молекулярные механизмы токсичности α -синуклеина, а также потенциальная эффективность антиагрегационной терапии для лечения БП. Клеточные модели на основе культур нейронального происхождения, экспрессирующие склонные к агрегации формы белка α -синуклеина человека, представляются наиболее удобными тест-системами для направленного поиска химических соединений, обладающих способностью ингибировать агрегацию α -синуклеина.

Методика

Получение генетических конструкторов в составе плазмидного вектора. Получение генетического конструктора, кодирующего белок α -синуклеин дикого типа (α -Syn WT), проводилось на основе тотальной комплементарной цепи ДНК (кДНК) человека методом ПЦР. Конструктор, кодирующий мутантную

форму белка A53T (α -Syn A53T), получали методом сайт-направленного мутагенеза [47, 48]. Исходные генетические конструкторы были любезно предоставлены проф. В.П. Бухманом. Полученные конструкторы клонировали в плазмидном векторе pcDNA3.1. Проводили рестрикцию вставки (α -Syn WT и α -Syn A53T) и вектора по сайтам встраивания ферментами Sfr274I (SibEnzyme, Россия) и HindIII (SibEnzyme, Россия). Продукт рестрикции наносили на гель-электрофорез и производили выделение из агарозного геля с использованием набора Cleanup S-Cap (Евроген, Россия) по протоколу производителя. Далее производили лигирование с использованием набора T4 ДНК лигазы (Евроген, Россия). Далее проводилась химическая трансформация компетентных клеток XL1-Blue (Евроген, Россия). Отбирали бактериальные колонии, выделяли плазмидную ДНК с использованием набора Plasmid Miniprep Color (Евроген, Россия) и анализировали на наличие вставки методом рестрикции. Последовательность вставки в отобранных плаزمиде подтверждалась методом секвенирования по Сэнгеру.

Клеточные культуры. Полученные плазмидные конструкторы, кодирующие α -синуклеин, использовались для трансфекции клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y. Клетки SH-SY5Y выращивались на круглых покровных стеклах, предварительно покрытых поли-L-лизин (ПанЭко, Россия), в количестве 20×10^3 на стекло, в среде DMEM/F12 (ПанЭко, Россия) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США). Через 24 ч после посева проводилась трансфекция культур с использованием реагента Lipofectamine™ 2000 (ThermoScientific, США). Готовились комплексы липофектамина и плазмидной ДНК (в соотношении 1 мкл на 500 нг соответственно) в среде без сыворотки, после 20-минутной инкубации комплекс добавляли к клеткам, через 3 ч среду меняли на свежую. Тестируемое соединение артемизинин добавляли в среду в концентрации 1 мкМ при смене среды после трансфекции. В качестве растворителя использовали диметилсульфоксид (ДМСО).

Иммуноцитохимическое окрашивание. Для экспериментов по анализу агрегации α -синуклеина в клетках *in vitro* через 20 ч после трансфекции к клеткам добавлялся ингибитор протеасом MG132 в концентрации 10 мкМ на 4 ч. В качестве растворителя использовали ДМСО. После чего проводили иммуноцитохимическое окрашивание клеток антителами к α -синуклеину (AB1903, Abcam, Великобритания) и маркеру апоптоза – активированной форме каспазы 3, CC3 (AB3623, Sigma-Aldrich, США). Клетки отмывали от среды с помощью фосфатно-солевого бу-

фера (ФСБ), фиксировали 4% параформальдегидом (ПФА) в течение 15 мин и проводили 5-минутную пермеабиллизацию холодным метанолом. Блокирование неспецифического связывания проводили в ФСБ-Твин20 с 5% козьей сывороткой в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее покровные стекла инкубировали с первичными антителами в разведении 1:1000 в блокирующем растворе в течение 1 ч при комнатной температуре. Промывали ФСБ и проводили инкубацию со вторичными флуоресцентно-меченными антителами Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor™ 568 (A-11011, Thermo Fisher Scientific, США) и Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor™ 488 (A-11029, Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:1000 в растворе ФСБ-Твин20 в течение 90 мин при комнатной температуре в темноте. Ядра клеток окрашивали с помощью 0,5 мкМ раствора DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) в течение 3 мин при комнатной температуре. Покровные стекла монтировали на стеклянные предметные стекла в каплю среды Immu-Mount (ThermoScientific, США).

Получение и анализ изображений. Микросъемка окрашенных стекол проводилась с помощью прибора Cyation 3 (BioTek, США) с использованием программного обеспечения Gen5 3.08 (BioTek, США). На стекле сканировалась область размером не менее 2000×2000 мкм в флуоресцентном режиме. Область сшивали в единое панорамное изображение и анализировали количество клеток, окрашенных на специфический маркер. Для оценки общего числа клеток проводили окрашивание с помощью DAPI и последующий автоматический анализ. Среднее количество клеток в анализируемой области составило 5 000 на 4 мм^2 и не различалось между разными экспериментами. Конфокальные изображения иммунофлуоресцентного окрашивания получены на конфокальном микроскопе Carl Zeiss LSM880 (Carl Zeiss, ФРГ). Все изображения были получены при постоянных настройках усиления и пинхола с разрешением 1024×1024 пикселей. Изображения агрегатов получали с помощью объектива 40X, 100X и 63X (при конфокальной микроскопии). Количественная оценка средней интенсивности окрашивания α -синуклеина проводилась путем измерения интенсивности окрашивания антителами к α -синуклеину в пределах поля зрения, для каждой группы было проанализировано по 10 полей зрения. Также оценивалось количество клеток с агрегатами α -синуклеина путем прямого подсчета.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью программных пакетов Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США) и GraphPad

Prism 8. Во всех случаях результаты представлены в виде среднего арифметического \pm стандартная ошибка среднего ($\bar{X} \pm m$). Детали статистического анализа для каждой группы данных приведены в описании к рисункам. Различия полученных результатов считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

В клетках нейробластомы человека SH-SY5Y моделировали экспрессию белка α -синуклеина дикого типа (α -Syn WT), а также его мутантной формы (α -Syn A53T) методом транзientной трансфекции с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine® 2000. Генетические конструкторы были получены на основе кДНК человека в плазмидном векторе pcDNA3.1. Для детекции рекомбинантного α -синуклеина в клетках использовали иммуноцитохимическую окраску антителами против α -синуклеина человека. В большинстве (около 80%) трансфицированных клеток наблюдалось равномерное распределение белка в цитоплазме без образования заметных скоплений (рис. 1, а/а, левая панель). Тогда как в оставшейся части клеток отмечалось выраженное накопление белка (более яркое окрашивание) и в тех из них, где его концентрация была наиболее высокой, обнаруживались плотные яркоокрашенные структуры с характерной для агрегатов морфологией (см. ниже).

Характер распределения белка и его агрегации не отличался для конструкторов α -Syn WT и α -Syn A53T. Таким образом, вне зависимости от формы белка (дикого типа или мутантный) обязательным условием для развития агрегации является высокий уровень его накопления в клетке. Одним из универсальных патологических факторов, способствующих накоплению склонных к агрегации белков в клетках нервной системы и приводящим к развитию протеинопатии, является нарушение утилизации неправильно свернутых белков [49, 50]. Для того чтобы смоделировать такое состояние, нами была использована обработка клеток ингибитором протеасом MG132. MG132 – широко распространенный пептидный альдегид, который легко проникает в клетки и избирательно ингибирует УПС деградации белков [51]. Известно, что ингибиторы протеасом способствуют накоплению патогенных модифицированных форм α -синуклеина и его агрегации [38, 51, 52]. На основании результатов ранее проведенных нами экспериментов по оценке токсичности MG132 для клеток SH-SY5Y (данные не представлены) была использована концентрация MG132 10 мкМ, которая вызывает умеренный стресс в культуре и снижает жизнеспособность клеток на 30% через 24 ч по-

сле начала инкубации. MG132 добавляли в питательную среду с клетками через 20 ч после трансфекции. К этому моменту в клетках нарабатывалось значительное количество рекомбинантного белка. При микроскопическом анализе уже через 4 ч после добавления MG132 наблюдалась выраженная агрегация α -синуклеина (рис. 1, а/а, правая панель), а через 24 ч отмечалась гибель большого числа трансфицированных клеток. Так как за данный временной интервал обработка клеток SH-SY5Y 10 мкМ MG132 не оказывает значительного эффекта на выживаемость клеток, можно заключить, что гибель объясняется токсическим действием агрегированных форм α -синуклеина. Для того, чтобы оценить агрегацию α -синуклеина в фазе активного роста и накопление агрегатов, дальнейший микроскопический анализ проводили на временной точке 4 ч после добавления MG132. При ингибировании УПС наблюдалась тенденция к увеличению числа клеток с агрегатами в культурах, экспрессирующих α -Syn WT, которая, однако, не достигала статистической значимости, тогда как при экспрессии α -Syn A53T количество таких клеток было значимо выше (рис. 1, б/б). Это свидетельствует о большей склонности α -Syn A53T к агрегации, которая проявляется в условиях нарушенной деградации белка. В этих же культурах был проведен анализ апоптотической гибели клеток с помощью окрашивания антителами к маркеру активированной каспазе 3 (CC3). В обычных условиях (без обработки MG132) количество CC3-позитивных клеток в культурах, экспрессирующих мутантную форму α -Syn A53T, было сравнимо с группой α -Syn WT, хотя и наблюдалась некоторая тенденция к увеличению таких клеток для α -Syn A53T (рис. 1, в/в). Обработка MG132 достоверно повышала уровень апоптоза, но в равной степени для обеих форм белка (α -Syn WT и α -Syn A53T), что может быть объяснено коротким временем (4 ч) инкубации с MG132 (рис. 1, в/в). Примечательно, что во многих гибнущих клетках (CC3-позитивных) не наблюдалось агрегации α -синуклеина или его значительного накопления. Можно предположить, что гибель клеток в данном случае обусловлена действием экзогенных токсичных форм α -синуклеина, источником которых являются соседние клетки, в том числе после их гибели и выделения содержимого в среду. Этот феномен требует дальнейшего изучения.

Более подробный анализ на большом увеличении (1000X), а также с использованием конфокальной микроскопии (630X), выявил наличие нескольких морфологических типов скоплений и агрегатов белка α -синуклеина в клетках SH-SY5Y: 1) гомогенное распределение белка по всей цитоплазме клетки без ви-

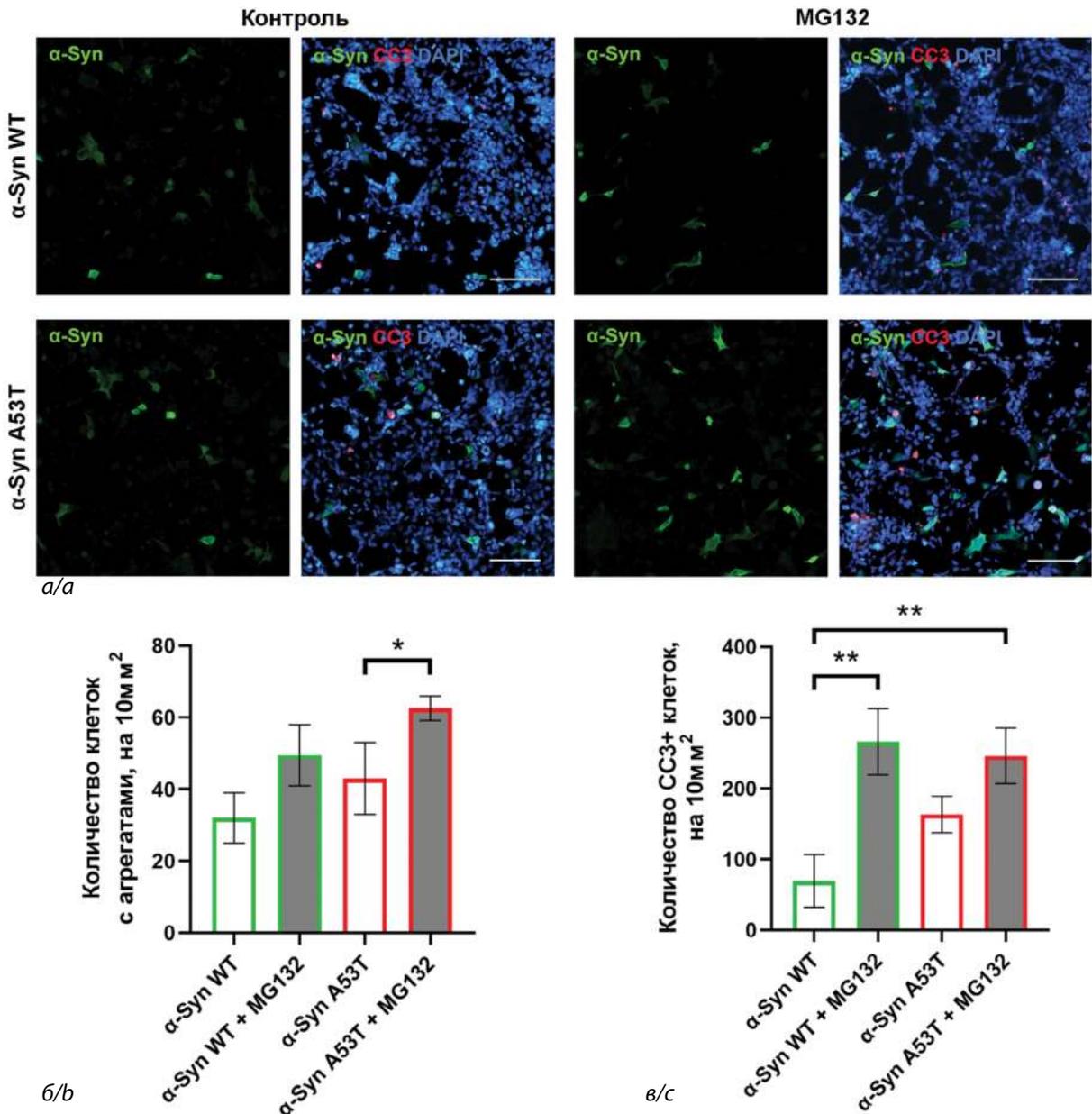


Рис. 1. Анализ агрегации рекомбинантного α-синуклеина дикого типа (α-Syn WT) и его мутантной формы (α-Syn A53T) в клетках SH-SY5Y при ингибировании убиквитин-протеасомной системы (обработка 10 мкМ MG132 в течение 4 ч) и в контрольных культурах (растворитель ДМСО).

a/a – репрезентативные микрофотографии иммуноцитохимического окрашивания культур клеток с помощью антител к α-синуклеину (зеленый) и активированной каспазе 3 (CC3, красный), ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм; *б/б* – количество клеток с агрегатами в анализируемых культурах; *в/с* – количество клеток, экспрессирующих маркер апоптоза – активированную каспазу 3 (CC3+ клетки), в анализируемых культурах. Однофакторный дисперсионный анализ, тест Фишера для множественных сравнений, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

Fig. 1. Analysis of recombinant wild-type α-synuclein (α-Syn WT) and its mutant form (α-Syn A53T) aggregation in SH-SY5Y cells following inhibition of the ubiquitin-proteasome system (treatment with 10 μM MG132 for 4 hours) and in control cultures (DMSO solvent).

a/a – representative immunocytochemical images of cultured cells stained with antibodies against α-synuclein (green) and cleaved caspase-3 (CC3, red), while nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 100 μm. *б/б* – quantification of cells containing protein aggregates in the analyzed cultures. *в/с* – quantification of apoptotic cells expressing the cleaved caspase-3 (CC3+) marker in the analyzed cultures. One-way ANOVA with Fisher's multiple comparison test, * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$.

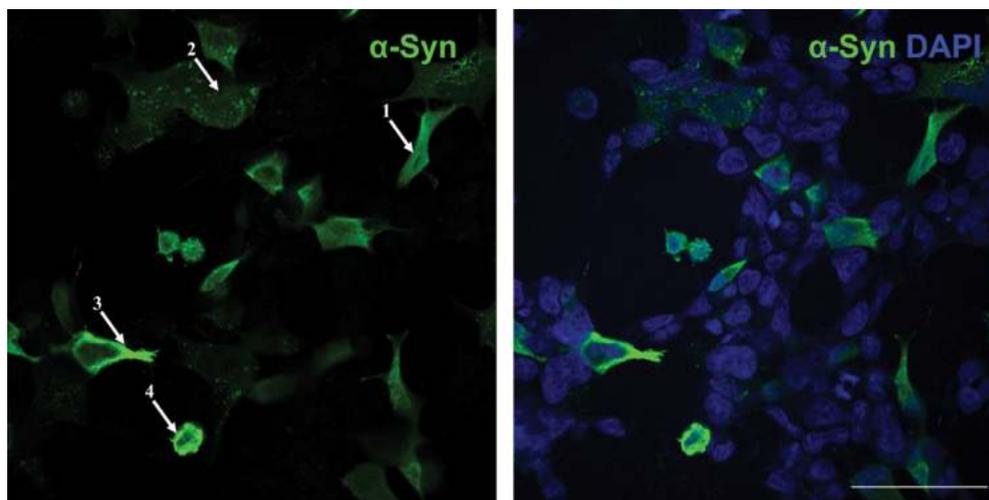


Рис. 2. Репрезентативные микрофотографии иммуноцитохимического окрашивания с помощью антител к α -синуклеину (зеленый) культур клеток SH-SY5Y, экспрессирующих α -Syn A53T при ингибировании убиквитин-протеасомной системы (обработка 10 μ M MG132 в течение 4 ч). Стрелками и цифрами указаны морфологические типы скопления белка α -синуклеина: 1 – гомогенное распределение, 2 – зернистые агрегаты, 3 – фибриллярные агрегаты, 4 – агресомы. Ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 50 μ m.

Fig. 2. Representative immunocytochemical images of SH-SY5Y cell cultures expressing α -Syn A53T stained with antibodies against α -synuclein (green) following inhibition of the ubiquitin-proteasome system (treatment with 10 μ M MG132 for 4 hours).

Arrows and numbers indicate different morphological types of α -synuclein accumulation: 1 – homogeneous distribution, 2 – granular aggregates, 3 – fibrillar aggregates, 4 – aggresomes. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 50 μ m.

димых фокусов скопления; 2) зернистые – множество мелких агрегатов рассеянных в цитоплазме; 3) фибриллярные – цепочечные и кольцевые околоядерные тяжи; 4) агресомы – крупные цитоплазматические включения округлой формы с ореолом, часто располагающиеся около ядра, которое из-за этого имеет вдавленную форму (рис. 2). Данные варианты образования агрегатов α -синуклеином были описаны ранее [53–55]. Таким образом, полученная клеточная модель агрегации α -синуклеина отражает основные патологические события, характерные для альфа-синуклеинопатии: постепенное накопление белка, ассоциированное с формированием агрегатов различной морфологии, которая отражает степень развития агрегации, а также активацию апоптотической гибели клеток в культуре.

Для валидации полученной клеточной модели в качестве инструмента для поиска новых химических соединений с потенциальной антиагрегационной активностью нами было проведено тестирование вещества с известными антиагрегационными и нейропротекторными свойствами – артемизинина. Антиагрегационные свойства артемизинина и его производных были ранее продемонстрированы на животных моделях болезни Альцгеймера, в нервной системе которых наблюдается агрегация β -амилои-

да и тау-белка [56–58]. Недавно нами было показано, что артемизинин способен также блокировать агрегацию белка TDP-43 в культуре клеток SH-SY5Y в концентрации 1 μ M [59]. Для оценки влияния артемизинина на агрегацию α -синуклеина были получены клетки, экспрессирующие мутантный белок α -Syn A53T. Сразу после трансфекции к клеткам добавляли артемизинин (1 μ M), а через 20 ч стимулировали агрегацию добавлением MG132, анализ проводили через 4 ч после этого. Артемизинин снижал общее количество клеток с агрегатами на 50% в сравнении с контрольной культурой, к которой добавляли только MG132 (рис. 3, а/а, б/б).

Примечательно, что артемизинин не оказывал влияния на количество клеток, содержащих агресомы (рис. 3, в/в), но при этом значительно снижал количество клеток с гомогенным распределением белка и фибриллярными агрегатами. В то же время клеток с зернистыми мелкими агрегатами становилось больше под действием артемизинина. Можно заключить, что артемизинин специфически влияет на конкретные этапы агрегации, сдвигая процесс в направлении образования и стабилизации мелких гранулярных агрегатов. Анализ влияния тестируемых соединений на конкретные типы агрегатов при условии их хорошей морфологической дифференциации может быть удобным

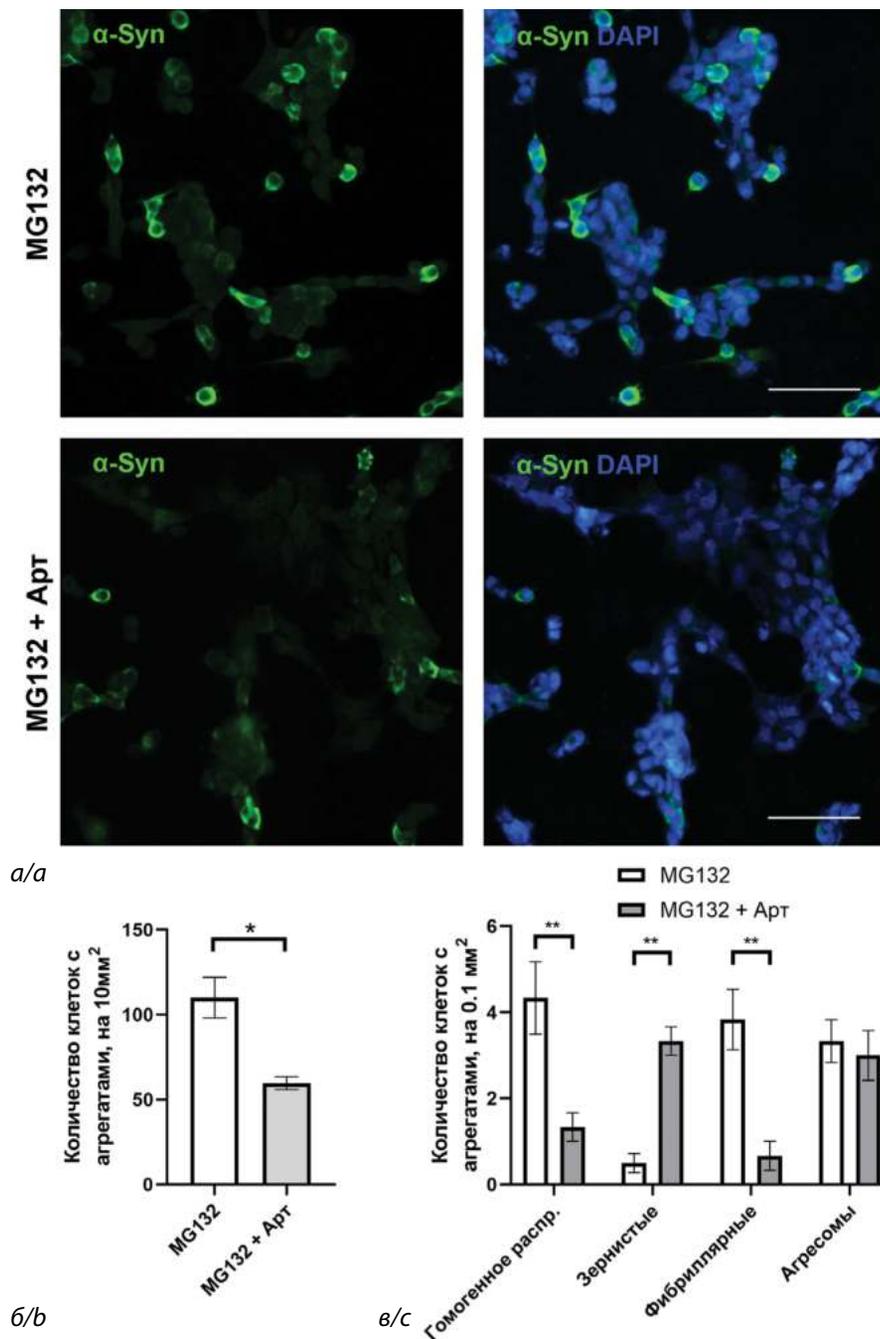


Рис. 3. Влияние артемизинина на агрегацию α -Syn A53T в клетках SH-SY5Y, при ингибировании убиквитин-протеасомной системы (обработка 10 мкМ MG132 в течение 4 ч).

a/a – репрезентативные микрофотографии клеток после обработки 1 мкМ артемизинина в течение 24 ч и 10 мкМ MG132 в течение последних 4 ч (MG132 + Арт) или только MG132 (MG132). Окрашивание проводилось с помощью антител к α -синуклеину (зеленый), ядра клеток окрашены DAPI (синий). Масштабный отрезок 100 мкм; *b/b* – количество клеток с агрегатами в анализируемых культурах. Тест Манна–Уитни, * – $p < 0.05$; *в/с* – количество клеток с разным типом скопления белка α -синуклеина после обработки 1 мкМ артемизинина в течение 24 ч и 10 мкМ MG132 в течение последних 4 ч (MG132 + Арт) или только MG132 (MG132). Двухфакторный дисперсионный анализ, тест Фишера для множественных сравнений, ** – $p < 0.01$.

Fig. 3. Effect of artemisinin on α -Syn A53T aggregation in SH-SY5Y cells following ubiquitin-proteasome system inhibition (treatment with 10 μ M MG132 for 4 hours).

a/a – representative micrographs of cells treated with 1 μ M artemisinin for 24 hours followed by 10 μ M MG132 for the last 4 hours (MG132 + Art) or only MG132 (MG132). Immunostaining was performed using antibodies against α -synuclein (green), and nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 100 μ m; *b/b* – quantification of cells with protein aggregates in the analyzed cultures. Mann–Whitney test, * – $p < 0.05$; *в/с* – distribution of cells with different types of α -synuclein accumulation following treatment with 1 μ M artemisinin for 24 hours and 10 μ M MG132 for the last 4 hours (MG132 + Art) or only MG132 (MG132). Two-way ANOVA, Fisher’s multiple comparison test, ** – $p < 0.01$.

инструментом для уточнения механизмов действия и ожидаемых эффектов при поиске потенциальных нейропротекторных препаратов.

Обсуждение

Нами была получена модель агрегации белка α -синуклеина на основе клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y человека, в которой воспроизводятся основ-

ные молекулярные патологические события, характерные для синуклеинопатии. В клетках наблюдается формирование характерных белковых отложений, образуемых α -синуклеином и оказывающих токсическое действие, что приводит к активации апоптотической гибели. Модель основана на транзientной экспрессии мутантной версии α -синуклеина A53T человека с дополнительной кратковременной обработкой

низкотоксичной концентрацией ингибитора протеасом MG132.

Известно, что увеличение числа копий гена *SCN1A* у человека, а значит уровня его экспрессии, само по себе может быть достаточным для развития паркинсонизма [60, 61]. Однако, в клеточных моделях со сверхэкспрессией α -синуклеина наблюдается, как правило, небольшое число клеток с агрегатами, а также отсутствие крупных агрегатов (телец Леви), которые обнаруживаются в аутопсийном материале пациентов с БП [42]. По-видимому, для развития полной картины заболевания необходимы дополнительные факторы, влияющие на способность клеток противостоять агрегации [62]. Для усиления агрегации α -синуклеина в клеточных культурах обычно используются различные токсины. Например, частота внутрицитоплазматических включений увеличивается при воздействии 1-метил-4-фенилпиридиния (MPP+), ротенона или ингибиторов протеасом [63-65]. Совместная экспрессия синфилина-1 – белка, взаимодействующего с α -синуклеином, может вызывать образование включений в клетках H4 [66], а также в клетках HEK293 [53]. Наконец, белок p25a, специфичный для мозга, также был идентифицирован как стимулятор агрегации α -синуклеина *in vitro* [67]. Нарушение работы УПС для усиления патологии, связанной с агрегацией α -синуклеина, представляется одной из самых оптимальных стратегий. С одной стороны, это обеспечивает непосредственное влияние на распад в клетке патологических форм белка, а с другой стороны, одним из механизмов токсического действия самого α -синуклеина является ингибирование УПС [35, 38, 68]. Таким образом, такой подход более полно моделирует патологические события в нервных клетках при БП.

Точные молекулярные механизмы, посредством которых α -синуклеин накапливается и способствует нейродегенерации при заболевании, остаются неизвестными. Идентификация и изучение различных продуктов агрегации α -синуклеина позволила предположить, что олигомеры и протофибриллы α -синуклеина обладают наибольшей нейротоксичностью [69]. Так, например, кольцеподобные олигомеры α -синуклеина взаимодействуют с цитоплазматической мембраной и образуют трансмембранные поры, вызывая аномальный внутриклеточный приток кальция [70]. Тогда как зрелые агрегаты могут рассматриваться в качестве менее токсичных конечных продуктов агрегации. Считается, что разные типы отложений представляют собой последовательные этапы накопления и агрегации α -синуклеина в клетке [71-73]. По мере увеличения локальной концентрации белка он переходит от го-

могенного равномерного распределения в цитоплазме к формированию мелких скоплений (фокусов), которые далее сливаются и образуют все более крупные агрегаты фибриллярной или более-менее округлой формы. На последних стадиях агрегации клетка может быть почти полностью заполнена одним или несколькими крупными перенуклеарными агрегатами (агресомами). Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что образование агресома не обязательно коррелирует с апоптотической гибелью клеток. Среди апоптотических клеток значительно больше агресомаотрицательных по сравнению с агресомаположительными [53]. Это свидетельствует в пользу того, что конечные продукты агрегации скорее выполняют защитную функцию, удерживая в себе токсичные формы белка. Понимание природы различных структур α -синуклеина, способов их формирования и их относительного вклада в α -синуклеин-опосредованную токсичность может послужить основой для разработки, профилактики и терапии заболеваний. Поэтому при скрининге новых потенциальных препаратов с антиагрегационной активностью необходимо использовать модели, в которых формируются различные типы агрегатов и определять, на какие из них влияет тестируемое соединение.

При поиске химических веществ с антиагрегационной активностью важным представляется оптимальный подбор тест-систем для обеспечения эффективного и надежного отбора соединений с заданными свойствами [74, 75]. Описанная в данной работе модель может быть использована в качестве тест-системы для отбора препаратов влияющих на агрегацию α -синуклеина. Отработаны подходы к анализу выраженности агрегации в клетках с помощью иммуноцитохимической окраски агрегатов и их морфологического анализа. Относительно небольшое время, необходимое для проведения тестирования, и легкость масштабирования при работе с иммортализованными клеточными линиями делает полученную модель удобным инструментом для высокопроизводительного скрининга больших библиотек соединений. С использованием данной модели нами показано, что артемизинин – соединение с известной антиагрегационной и нейропротекторной активностью, способен подавлять агрегацию α -синуклеина в первую очередь за счет уменьшения количества ранних продуктов агрегации и при этом не влияя на образование агресома. Интересно, что под действием артемизинина увеличивалось количество клеток, содержащих мелкие гранулярные агрегаты, которые могут служить предшественниками агресома. Таким образом, описываемая нами модельная

система позволяет также оценивать влияние тестируемых соединений на развитие протеинопатии, в частности изменение направления в сторону образования конечных или более ранних продуктов агрегации.

Литература/ References

- Uversky V.N. A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2003; 21: 211-34. <https://doi.org/10.1080/07391102.2003.10506918>
- Burre J., Sharma M., Sudhof T.C. Cell Biology and Pathophysiology of alpha-Synuclein. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2018; 8: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024091>
- Weinreb P.H., Zhen W., Poon A.W., Conway K.A., Lansbury P.T., Jr. NACP. A protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry*. 1996; 35: 13709-15. <https://doi.org/10.1021/bi961799n>
- Davidson W.S., Jonas A., Clayton D.F., George J.M. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *The Journal of biological chemistry*. 1998; 273: 9443-9. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.16.9443>
- Bartels T., Choi J.G., Selkoe D.J. Alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 2011; 477: 107-10. <https://doi.org/10.1038/nature10324>
- Pringsheim T., Jette N., Frolkis A., Steeves T.D. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. 2014; 29: 1583-90. <https://doi.org/10.1002/mds.25945>
- Fusco G., De Simone A., Gopinath T., Vostrikov V., Vendruscolo M., Dobson C.M., et al. Direct observation of the three regions in alpha-synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nature communications*. 2014; 5: 3827. <https://doi.org/10.1038/ncomms4827>
- Lautenschlager J., Stephens A.D., Fusco G., Strohl F., Curry N., Zacharopoulou M., et al. C-terminal calcium binding of alpha-synuclein modulates synaptic vesicle interaction. *Nature communications*. 2018; 9: 712. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03111-4>
- Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience*. 2001; 2: 492-501. <https://doi.org/10.1038/35081564>
- Spillantini M.G., Schmidt, M.L., Lee V.M., Trojanowski J.Q., Jakes R., Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997; 388: 839-40. <https://doi.org/10.1038/42166>
- Srinivasan E., Chandrasekhar G., Chandrasekar P., Anbarasu K., Vickram A.S., Karunakaran R., et al. Alpha-Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease. *Frontiers in medicine*. 2021; 8: 736978. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.736978>
- Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997; 276: 2045-7. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>
- Ly Z., Krasnoslobodtsev A.V., Zhang Y., Ysselstein D., Rochet J.C., Blanchard S.C., et al. Direct Detection of alpha-Synuclein Dimerization Dynamics: Single-Molecule Fluorescence Analysis. *Biophysical journal*. 2015; 108: 2038-47. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.03.010>
- Ohgita T., Namba N., Kono H., Shimanouchi T., Saito H. Mechanisms of enhanced aggregation and fibril formation of Parkinson's disease-related variants of alpha-synuclein. *Scientific reports*. 2022; 12: 6770. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10789-6>
- Lazaro D.F., Rodrigues E.F., Langohr R., Shahpasandzadeh H., Ribeiro T., Guerreiro P., et al. Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation. *PLoS genetics*. 2014; 10: e1004741. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004741>
- Teravskis P.J., Covelo A., Miller E.C., Singh B., Martell-Martinez H.A., Benneyworth M.A., et al. A53T Mutant Alpha-Synuclein Induces Tau-Dependent Postsynaptic Impairment Independently of Neurodegenerative Changes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2018; 38: 9754-67. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0344-18.2018>
- Smith W.W., Jiang H., Pei Z., Tanaka Y., Morita H., Sawa A., et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Human molecular genetics*. 2005; 14: 3801-11. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi396>
- Mercado G., Castillo V., Vidal R., Hetz C. ER proteostasis disturbances in Parkinson's disease: novel insights. *Frontiers in aging neuroscience*. 2015; 7: 39. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00039>
- Colla E., Coune P., Liu Y., Pletnikova O., Troncoso J.C., Iwatsubo T., et al. Endoplasmic reticulum stress is important for the manifestations of alpha-synucleinopathy in vivo. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012; 32: 3306-20. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5367-11.2012>
- Chen X., Shi C., He M., Xiong S., Xia X. Endoplasmic reticulum stress: molecular mechanism and therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy*. 2023; 8: 352. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01570-w>
- Hipp M.S., Kasturi P., Hartl F.U. The proteostasis network and its decline in ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2019; 20: 421-35. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0101-y>
- Busch D.J., Oliphant P.A., Walsh R.B., Banks S.M., Woods W.S., George J.M., et al. Acute increase of alpha-synuclein inhibits synaptic vesicle recycling evoked during intense stimulation. *Molecular biology of the cell*. 2014; 25: 3926-41. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-02-0708>
- Roman-Vendrell C., Medeiros A.T., Sanderson J.B., Jiang H., Bartels T., Morgan J.R. Effects of Excess Brain-Derived Human alpha-Synuclein on Synaptic Vesicle Trafficking. *Frontiers in neuroscience*. 2021; 15: 639414. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.639414>
- Lotharius J., Barg S., Wiekop P., Lundberg C., Raymon H.K., Brundin P. Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277: 38884-38894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205518200>
- Oliveira da Silva M.I., Liz M.A. Linking Alpha-Synuclein to the Actin Cytoskeleton: Consequences to Neuronal Function. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020; 8: 787. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00787>
- Cartelli D., Aliverti A., Barbiroli A., Santambrogio C., Ragg E.M., Casagrande F.V., et al. Alpha-Synuclein is a Novel Microtubule Dynamase. *Scientific reports*. 2016; 6: 33289. <https://doi.org/10.1038/srep33289>
- Angelova P.R., Ludtmann M.H., Horrocks M.H., Negoda A., Cremades N., Klenerman D., et al. Ca²⁺ is a key factor in alpha-synuclein-induced neurotoxicity. *Journal of cell science*. 2016; 129: 1792-801. <https://doi.org/10.1242/jcs.180737>

28. Potdar C., Kaushal A., Raj A., Mallick R., Datta I. Reduction of phosphorylated alpha-synuclein through downregulation of casein kinase 2alpha alleviates dopaminergic-neuronal function. *Biochemical and biophysical research communications*. 2022; 615: 43-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.05.023>
29. Bir A., Sen O., Anand S., Khemka V.K., Banerjee P., Cappai R., et al. Alpha-Synuclein-induced mitochondrial dysfunction in isolated preparation and intact cells: implications in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*. 2014; 131: 868-77. <https://doi.org/10.1111/jnc.12966>
30. Ganguly U., Chakrabarti S.S., Kaur U., Mukherjee A., Chakrabarti S. Alpha-synuclein, Proteotoxicity and Parkinson's Disease: Search for Neuroprotective Therapy. *Current neuropharmacology*. 2018; 16: 1086-97. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666171129100944>
31. Di Maio R., Barrett P.J., Hoffman E.K., Barrett C.W., Zharikov A., Borah A., et al. Alpha-Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Science translational medicine*. 2016; 8: 342ra378. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3634>
32. Deas E., Cremades N., Angelova P.R., Ludtmann M.H., Yao Z., Chen S., et al. Alpha-Synuclein Oligomers Interact with Metal Ions to Induce Oxidative Stress and Neuronal Death in Parkinson's Disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2016; 24: 376-91. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6343>
33. Ebrahimi-Fakhari D., Cantuti-Castelvetri I., Fan Z., Rockenstein E., Masliah E., Hyman B.T., et al. Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of alpha-synuclein. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011; 31: 14508-20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1560-11.2011>
34. Webb J.L., Ravikumar B., Atkins J., Skepper J.N., Rubinsztein D.C. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278: 25009-13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300227200>
35. Nonaka T., Hasegawa M. A cellular model to monitor proteasome dysfunction by alpha-synuclein. *Biochemistry*. 2009; 48: 8014-22. <https://doi.org/10.1021/bi900619j>
36. Martinez-Vicente M., Talloczy Z., Kaushik S., Massey A.C., Mazzulli J., Mosharov E.V., et al. Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of clinical investigation*. 2008; 118: 777-88. <https://doi.org/10.1172/JCI32806>
37. Stefanis L., Larsen K.E., Rideout H.J., Sulzer D., Greene L.A. Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2001; 21: 9549-60. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09549.2001>
38. McKinnon C., De Snoo M.L., Gondard E., Neudorfer C., Chau H., Ngana S.G., et al. Early-onset impairment of the ubiquitin-proteasome system in dopaminergic neurons caused by alpha-synuclein. *Acta neuropathologica communications*. 2020; 8: 17. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-0894-0>
39. Lim K.L., Tan J.M. Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC biochemistry*. 2007; 8 Suppl 1: S13. <https://doi.org/10.1186/1471-2091-8-S1-S13>
40. Rott R., Szargel R., Haskin J, Bandopadhyay R., Lees A.J., Shani V., et al. Alpha-Synuclein fate is determined by USP9X-regulated monoubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011; 108: 18666-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105725108>
41. Lazaro D.F., Pavlou M.A.S., Outeiro T.F. Cellular models as tools for the study of the role of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Experimental neurology*. 2017; 298: 162-71. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.05.007>
42. Delenclos M., Burgess J.D., Lamprokostopoulou A., Outeiro T.F., Vekrellis K., McLean P.J. Cellular models of alpha-synuclein toxicity and aggregation. *Journal of neurochemistry*. 2019; 150: 566-76. <https://doi.org/10.1111/jnc.14806>
43. Visanji N.P., Brotchie J.M., Kalia L.V., Koprich J.B., Tandon A., Watts J.C., et al. Alpha-Synuclein-Based Animal Models of Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities in a New Era. *Trends in neurosciences*. 2016; 39: 750-62. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.09.003>
44. Koprich J.B., Kalia L.V., Brotchie J.M. Animal models of alpha-synucleinopathy for Parkinson disease drug development. *Nature reviews. Neuroscience*. 2017; 18: 515-29. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.75>
45. Gomez-Benito M., Granado N., Garcia-Sanz P., Michel A., Dumoulin M., Moratalla R. Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. *Frontiers in pharmacology*. 2020; 11: 356. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00356>
46. Goedert M., Jakes R., Spillantini M.G. The Synucleinopathies: Twenty Years On. *Journal of Parkinson's disease*. 2017; 7: S51-S69. <https://doi.org/10.3233/JPD-179005>
47. Kunkel T.A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82: 488-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.2.488>
48. Xia Y., Chu W., Qi Q., Xun L. New insights into the QuikChange process guide the use of Phusion DNA polymerase for site-directed mutagenesis. *Nucleic acids research*. 2015; 43: e12. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1189>
49. Smith D.M. Could a Common Mechanism of Protein Degradation Impairment Underlie Many Neurodegenerative Diseases? *Journal of experimental neuroscience*. 2018; 12: 1179069518794675. <https://doi.org/10.1177/1179069518794675>
50. Amirian R., Badrbani M.A., Derakhshankhah H., Izadi Z., Shahbazi M.A. Targeted protein degradation for the treatment of Parkinson's disease: Advances and future perspective. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2023; 166: 115408. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115408>
51. Bang Y., Kang B.Y., Choi H.J. Preconditioning stimulus of proteasome inhibitor enhances aggresome formation and autophagy in differentiated SH-SY5Y cells. *Neuroscience letters*. 2014; 566: 263-8. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.02.056>
52. Kim Y.M., Jang W.H., Quezado M.M., Oh Y., Chung K.C., Junn E., et al. Proteasome inhibition induces alpha-synuclein SUMOylation and aggregate formation. *Journal of the neurological sciences*. 2011; 307: 157-61. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.04.015>
53. Tanaka M., Kim Y.M., Lee G., Junn E., Iwatsubo T., Mouradian M.M. Aggresomes formed by alpha-synuclein and synphilin-1 are cytoprotective. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279: 4625-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310994200>
54. Opazo F., Krenz A., Heermann S., Schulz J.B., Falkenburger B.H. Accumulation and clearance of alpha-synuclein aggregates demonstrated by time-lapse imaging. *Journal of neurochemistry*. 2008; 106: 529-40. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05407.x>

55. Dhakal S., Mondal M., Mirzazadeh A., Banerjee S., Ghosh A., Rangachari V. alpha-Synuclein emulsifies TDP-43 prion-like domain-RNA liquid droplets to promote heterotypic amyloid fibrils. *Communications biology*. 2023; 6: 1227. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05608-1>
56. Kiss E., Kins S., Zoller Y., Schilling S., Gorgas K., Gross D., et al. Artesunate restores the levels of inhibitory synapse proteins and reduces amyloid-beta and C-terminal fragments (CTFs) of the amyloid precursor protein in an AD-mouse model. *Molecular and cellular neurosciences*. 2021; 113: 103624. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2021.103624>
57. Xiao M., Xiang W., Chen Y., Peng N., Du X., Lu S., et al. DHA Ameliorates Cognitive Ability, Reduces Amyloid Deposition, and Nerve Fiber Production in Alzheimer's Disease. *Frontiers in nutrition*. 2022; 9: 852433. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.852433>
58. Kisler K., Sagare A.P., Lazic D., Bazzi S., Lawson E., Hsu C.J., et al. Anti-malaria drug artesunate prevents development of amyloid-beta pathology in mice by upregulating PICALM at the blood-brain barrier. *Molecular neurodegeneration*. 2023; 18: 7. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00597-5>
59. Pukhov S.A., Semakov A.V., Pukaeva N.E., Kukharskaya O.A., Ivanova T.V., Kryshkova V.S., et al. Artemisinin Stimulates Neuronal Cell Viability and Possess a Neuroprotective Effect In Vitro. *Molecules*. 2025; 30: <https://doi.org/10.3390/molecules30010198>
60. Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet*. 2004; 364: 1167-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)17103-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)17103-1)
61. Devine M.J., Gwinn K., Singleton A., Hardy J. Parkinson's disease and alpha-synuclein expression. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2011; 26: 2160-8. <https://doi.org/10.1002/mds.23948>
62. Kim H.J., Jeon B.S., Yoon M.Y., Park S.S., Lee K.W. Increased expression of alpha-synuclein by SNCA duplication is associated with resistance to toxic stimuli. *Journal of molecular neuroscience: MN*. 2012; 47: 249-55. <https://doi.org/10.1007/s12031-012-9732-6>
63. Lee H.J., Shin S.Y., Choi C., Lee Y.H., Lee S.J. Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. *The Journal of biological chemistry*. 2002; 277: 5411-7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105326200>
64. Wan O.W., Chung K.K. The role of alpha-synuclein oligomerization and aggregation in cellular and animal models of Parkinson's disease. *PLoS one*. 2012; 7: e38545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038545>
65. Kalivendi S.V., Cunningham S., Kotamraju S., Joseph J., Hillard C.J., Kalyanaraman B. Alpha-synuclein up-regulation and aggregation during MPP⁺-induced apoptosis in neuroblastoma cells: intermediacy of transferrin receptor iron and hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279: 15240-7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312497200>
66. McLean P.J., Kawamata H., Hyman B.T. Alpha-synuclein-enhanced green fluorescent protein fusion proteins form proteasome sensitive inclusions in primary neurons. *Neuroscience*. 2001; 104: 901-12. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00113-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00113-0)
67. Lindersson E., Lundvig D., Petersen C., Madsen P., Nyengaard J.R., Hojrup P., et al. P25alpha Stimulates alpha-synuclein aggregation and is co-localized with aggregated alpha-synuclein in alpha-synucleinopathies. *The Journal of biological chemistry*. 2005; 280: 5703-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410409200>
68. Lindersson E., Beedholm R., Hojrup P., Moos T., Gai W., Hendil K.B., et al. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. *The Journal of biological chemistry*. 2004; 279: 12924-34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306390200>
69. Kalia L.V., Kalia S.K., McLean P.J., Lozano A.M., Lang A.E. Alpha-Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Annals of neurology*. 2013; 73: 155-69. <https://doi.org/10.1002/ana.23746>
70. Calabresi P., Mechelli A., Natale G., Volpicelli-Daley L., Di Lazzaro G., Ghiglieri V. Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell death & disease*. 2023; 14: 176. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05672-9>
71. Ray S., Singh N., Kumar R., Patel K., Pandey S., Datta D., et al. Alpha-Synuclein aggregation nucleates through liquid-liquid phase separation. *Nature chemistry*. 2020; 12: 705-16. <https://doi.org/10.1038/s41557-020-0465-9>
72. Alam P., Bousset L., Melki R., Otzen D.E. alpha-synuclein oligomers and fibrils: a spectrum of species, a spectrum of toxicities. *Journal of neurochemistry*. 2019; 150: 522-34. <https://doi.org/10.1111/jnc.14808>
73. de Oliveira G.A.P., Silva J.L. Alpha-synuclein stepwise aggregation reveals features of an early onset mutation in Parkinson's disease. *Communications biology*. 2019; 2: 374. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0598-9>
74. Home R.I., Andrzejewska E.A., Alam P., Brotzakis Z.F., Srivastava A., Aubert A., et al. Discovery of potent inhibitors of alpha-synuclein aggregation using structure-based iterative learning. *Nature chemical biology*. 2024; 20: 634-45. <https://doi.org/10.1038/s41589-024-01580-x>
75. Gitto R., Vittorio S., Bucolo F., Pena-Diaz S., Siracusa R., Cuzzocrea S., et al. Discovery of Neuroprotective Agents Based on a 5-(4-Pyridinyl)-1,2,4-triazole Scaffold. *ACS chemical neuroscience*. 2022; 13: 581-6. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.1c00849>

Сведения об авторах:

Пукаева Надежда Евгеньевна, мл. науч. сотр., лаб. молекулярно-генетических механизмов нейродегенерации, ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН; инженер, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Кухарская Ольга Александровна, канд. биол. наук, науч. сотр., лаб. молекулярно-генетических механизмов нейродегенерации, ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН; доцент, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Иванова Татьяна Витальевна, лаборант, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Наздрачева Майя Романовна, лаборант, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Бурак Марина Владимировна, лаборант, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Попов Александр Александрович, ассистент, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Овчинников Руслан Константинович, канд. мед. наук, науч. сотр., лаб. молекулярно-генетических механизмов нейродегенерации, ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН; доцент, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Антохин Александр Иванович, доктор биол. наук, проф., каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;

Московцев Алексей Александрович, канд. мед. наук, доцент, каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; руководитель центра коллективного пользования научным оборудованием, ФГБНУ «НИИОПП»;

Кухарский Михаил Сергеевич, доктор биол. наук, зав. лаб. молекулярно-генетических механизмов нейродегенерации, ИФАВ ФИЦ ПХФ и МХ РАН; зав. каф., каф. общей и клеточной биологии МБФ, ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России.