

Научная статья

УДК 57.085.23

doi: 10.17223/19988591/69/12

Моделирование нейродегенеративных заболеваний, вызванных протеинопатиями, на культурах клеток человека

Анастасия Александровна Малахова¹, Элина Равильевна Аллаярова²,
Динара Витальевна Шарипова³, Софья Викторовна Павлова⁴,
Елена Викторовна Григорьева⁵, Сергей Петрович Медведев⁶,
Сурен Минасович Закиян⁷

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7} *Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

^{2, 3} *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия*

^{1, 4, 5, 6, 7} *Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия*

¹ <https://orcid.org/0000-0003-1916-1333>, amal@bionet.nsc.ru

² e.allayarova@gsu.nsu.ru

³ d.sharipova@gsu.nsu.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>, spav@bionet.nsc.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>, evlena@bionet.nsc.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>, medvedev@bionet.nsc.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>, zakian@bionet.nsc.ru

Аннотация. Причиной развития большинства нейродегенеративных заболеваний являются протеинопатии, связанные с накоплением в нейронах агрегатов неправильно свернутых белков синуклеина при болезни Паркинсона, амилоида при болезни Альцгеймера, хантингтина при болезни Гентингтона и др., что приводит к нарушению функционирования лизосомального аппарата, дисфункции митохондрий и в конечном итоге к клеточной гибели. Для изучения патологических процессов, приводящих к гибели нейронов, нами созданы клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с доксициклин-управляемой экспрессией альфа-синуклеина (SNCA), содержащего эпитопы 3×FLAG и 2×Strep-Tag II, необходимые для аффинной очистки белковых комплексов, взаимодействующих с альфа-синуклеином. Трансгены, кодирующие химерный белок SNCA-C-3XFLAG-2XST и трансактиватор M2rtTA, внесены в локус *AATSI* ИПСК пациента с болезнью Паркинсона с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Подтвержден плюрипотентный статус полученных трансгенных клонов ИПСК и проведена направленная дифференцировка в нейроны. Экспрессия SNCA-C-3XFLAG-2XST в нейронах, дифференцированных из ИПСК, подтверждена Вестерн-блот-анализом. Полученные клеточные модели обладают способностью к неограниченной пролиферации в культуре, что позволяет планировать эксперименты по изучению взаимодействий альфа-синуклеина с различными белками и структурами в клетках человека при синуклеинопатиях, а также проводить тестирование потенциальных лекарственных препаратов на любых типах клеток организма человека, которые можно получить в результате направленной дифференцировки ИПСК.

Ключевые слова: клеточные модели на основе ИПСК, протеинопатия, альфа-синуклеин, нейродегенеративные заболевания, CRISPR/Cas9

Источник финансирования: работа выполнена при поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в соответствии с проектом № 2023-573-05/2023.

Благодарности: в работе использовали оборудование Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/ckpmtabo/>), поддержан бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН FWNR-2022-0015), а также ЦКП «Геномика» СО РАН (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility>).

Для цитирования: Малахова А.А., Аллаярова Э.Р., Шарипова Д.В., Павлова С.В., Григорьева Е.В., Медведев С.П., Закян С.М. Моделирование нейродегенеративных заболеваний, вызванных протеинопатией, на культурах клеток человека // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2025. № 69. С. 103–112. doi: 10.17223/19988591/69/12

Original article

doi: 10.17223/19988591/69/12

In vitro models of proteinopathy-associated neurodegenerative diseases

Anastasia A. Malakhova¹, Elina R. Allayarova², Dinara V. Sharipova³,
Sophia V. Pavlova⁴, Elena V. Grigor'eva⁵, Sergey P. Medvedev⁶,
Suren M. Zakian⁷

^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7} Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the RAS,
Novosibirsk, Russia

^{2, 3} Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

^{1, 4, 5, 6, 7} Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch
of the RAS, Novosibirsk, Russia

¹ <https://orcid.org/0000-0003-1916-1333>, amal@bionet.nsc.ru

² e.allayarova@gsu.nu.ru

³ d.sharipova@gsu.nu.ru

⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>, spav@bionet.nsc.ru

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>, evlana@bionet.nsc.ru

⁶ <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>, medvedev@bionet.nsc.ru

⁷ <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>, zakian@bionet.nsc.ru

Summary. Most neurodegenerative diseases are caused by proteinopathies associated with accumulation of misfolded protein aggregates in neurons - synuclein in Parkinson's, amyloid in Alzheimer's, huntingtin in Huntington's, etc. This leads to lysosomal dysfunction, mitochondrial dysfunction and ultimately cell death. To study the pathological processes leading to neuronal death, we have generated cell models with doxycycline-controlled expression of alpha-synuclein (SNCA) containing 3×FLAG and 2×Strep-Tag II epitopes necessary for affine purification of protein complexes interacting with alpha-synuclein. The induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a patient with Parkinson's disease m10.7 was chosen as the starting line to create a cell model of the synucleopathy. This line is registered in the hPSCreg human pluripotent stem cell registry as ICGi041-A. Transgenes encoding the chimeric protein SNCA-C-3XFLAG-2XST and the transactivator M2rtTA were introduced into the *AAVS1* locus of the m10.7 iPSCs line using the CRISPR/Cas9 genome editing system. The pluripotent status of the resulting transgenic iPSC clones was confirmed and directed differentiation into neurons was performed (See Fig. 1a-b). The expression of SNCA-C-3XFLAG-2XST in neurons differentiated from iPSCs was demonstrated by Western

blot analysis (See Fig. 1c). The cell models obtained have the ability to proliferate indefinitely in culture. This makes it possible to design experiments to study the interactions of alpha-synuclein with different proteins and structures in human cells with synucleinopathies, as well as to test potential drugs on any type of human body cell that can be obtained as a result of directed differentiation of iPSCs.

The article contains 1 Figure, 12 References.

Keywords: iPSC-based cell models, proteinopathy, alpha-synuclein, neurodegenerative diseases, CRISPR/Cas9

Fundings: This research was funded by Fund for Scientific and Technological Development of Ugra, according to project number 2023-573-05/2023.

Acknowledgments: The immunofluorescent imaging was performed using resources of the Common Facilities Center of Microscopic Analysis of Biological Objects, ICG SB RAS (<https://ckp.icgen.ru/ckpmabo/>), supported by the state project of the Institute of Cytology and Genetics (FWNR-2022-0015). Sanger sequencing was performed at the SB RAS Genomics Core Facility (<http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/corefacility>).

For citation: Malakhova AA, Allayarova ER, Sharipova DV, Pavlova SV, Grigor'eva EV, Medvedev SP, Zakian SM. In vitro models of proteinopathy-associated neurodegenerative diseases. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya = Tomsk State University Journal of Biology*. 2025;69:103-112. doi: 10.17223/19988591/69/12

Введение

Протеинопатии – это заболевания, при которых наблюдается изменение конформации определенного белка, приобретение им токсической активности и потеря нормальной функции. К протеинопатиям относится большое число болезней, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь диффузных телец Леви, прионные заболевания, таупатии, боковой амиотрофический склероз, лобно-височная дегенерация, а также такие редкие заболевания, как британская и датская деменции [1]. Болезнь Паркинсона является одним из самых распространенных нейродегенеративных заболеваний, которое связано с гибелью нейронов черной субстанции головного мозга, продуцирующих нейромедиатор дофамин. Недостаточность дофамина вызывает целый набор тяжелых симптомов, среди которых брадикинезия, ригидность мышц и тремор [2]. Для болезни Паркинсона характерна клиническая и генетическая гетерогенность, что приводит к большим трудностям при разработке новых лекарственных препаратов против данного заболевания. Клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) являются незаменимым инструментом биомедицинских исследований. ИПСК обладают способностью к неограниченной пролиферации в культуре, что позволяет планировать масштабные эксперименты по изучению механизмов развития заболеваний и тестирование потенциальных лекарственных препаратов на любых типах клеток организма человека, которые можно получить в результате направленной дифференцировки. Моделирование нейродегенеративных заболеваний *in vitro* имеет особенно важное значение в связи с ограниченной доступностью био-

материала для исследований, а также отсутствием методов терапии, позволяющих исключить причины развития патологических процессов, приводящих к гибели нейронов.

Генетические и патофизиологические исследования пациентов с болезнью Паркинсона, деменцией с тельцами Леви, множественной системной атрофией демонстрируют вовлеченность альфа-синуклеина (SNCA) в развитие целого ряда патологий, объединяемых в группу синуклеинопатий [3]. На терминальных стадиях развития данных болезней SNCA входит в состав так называемых телец Леви – многокомпонентных белковых агрегатов, однако до сих пор доподлинно неизвестен конкретный механизм патологического действия данного белка на жизнеспособность нейронов головного мозга. Для обеспечения прогресса в данном направлении необходима разработка экспериментальных систем, которые предназначены для выяснения паттерна взаимодействия SNCA с различными белками и структурами в нейронах человека. Для изучения состава белковых комплексов в культурах клеток было предложено использовать тандемную очистку аффинными смолами, связывающими якорные пептиды 3×FLAG и 2×Strep-Tag II целевого белка [4]. Целью данной работы является создание клеточной модели на основе ИПСК с доксициклин-управляемой экспрессией SNCA с эпитопами 3×FLAG и 2×Strep-Tag II, позволяющей проводить изучение межмолекулярных взаимодействий SNCA и механизмов развития нейродегенерации при синуклеинопатии.

Материалы и методы

Линия ИПСК m10.7 (зарегистрирована в международном реестре плюрипотентных стволовых клеток человека hPSCreg под именем ICGi041-A, <https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi041-A>, дата последнего доступа 31.07.2024) была получена из мононуклеарных клеток крови пациента с болезнью Паркинсона и охарактеризована на наличие признаков плюрипотентности методами иммунофлуоресцентного окрашивания и количественной ПЦР, как описано ранее [5]. Трансген SNCA с эпитопами 3×FLAG и 2×Strep-Tag II под управлением доксициклин-зависимого промотора, а также трансген трансаktиватора M2rtTA были внесены в locus *AAVS1* линии ИПСК m10.7 с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 [6]. В качестве донорной последовательности для внесения трансгена SNCA в locus *AAVS1* использовали плазмиду pSNCA-C-3XFLAG-2XST-donor, конструкция которой защищена патентом [7]. Полученные трансгенные клоны ИПСК были проверены на наличие целевых и нецелевых встроок в геном с помощью ПЦР-скрининга [6]. Анализ экспрессии трансгена SNCA-C-3XFLAG-2XST проверяли с помощью количественной ПЦР с праймерами, подобранными на последовательности, кодирующие 3×FLAG и 2×Strep-Tag II (CGAAGCCCAACSTTTTCATAGA/CCCACCCTCAGTTTGAGAAG). Проведена направленная дифференцировка полученных трансгенных линий ИПСК в дофаминергические нейроны по протоколу, описанному Oosterveen et al. [8]. Наличие белкового продукта трансгена SNCA-C-3XFLAG-

2XST в нейронах, дифференцированных из ИПСК, подтвердили с помощью Вестерн-блот-анализа. Для приготовления тотальных белковых экстрактов клетки лизировали в холодном буфере RIPA (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% NP-40) с добавлением ингибиторов фосфатаз и протеаз (Thermo Fisher Scientific) в расчете 24 мкл RIPA буфера на 100 тыс. клеток. Лизировали в течение 30 мин на шейкере при +4°C. Затем образцы центрифугировали при 14000g 15 мин, супернатант фасовали по 24 мкл на леду, образцы хранили при –70°C. Нормализованные по количеству белка тотальные экстракты смешивали с равным объемом буфера Лэммли (2% SDS, 20% глицерол, 10% 2-меркаптоэтанол, 0,004% бромфеноловый синий, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8), перемешивали, инкубировали в течение 5 мин при температуре 95°C и наносили на гель в количестве 20–40 мкг на дорожку. Электрофоретическое разделение белков проводили в 15%-ном полиакриламидном геле в буфере, содержащем 2,5 mM Tris, 1,92 mM глицин, 0,01% SDS. После разделения белки переносили на мембрану Immun-Blot PVDF Membrane For Protein Blotting (Bio-Rad) при постоянном токе 150 mA в течение 0,5 ч в буфере для переноса (2,5 mM Tris, 19,2 mM глицин, 20% метанол). Мембрану фиксировали в 0,4%-ном параформальдегиде в течение 30 мин, затем помещали в блокирующий раствор (фосфатно-солевой буфер PBS, 0,1% Triton X-100, 2% сухое молоко) на 1 ч при комнатной температуре. Далее инкубировали с первичными антителами в течение 14–16 часов при +4°C. Мембрану трижды отмывали в растворе PBST (фосфатно-солевой буфер PBS, 0,1% Triton X-100) по 5 мин, а затем инкубировали со вторичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре. По истечении времени трижды отмывали мембрану в растворе PBST. Детекцию осуществляли с использованием набора для хемилюминесцентной детекции ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad).

Результаты исследования и обсуждение

В настоящее время не существует надежной модели, подходящей для изучения механизмов развития нейродегенеративных заболеваний, несмотря на активные исследования в этой области [9]. ИПСК человека обладают рядом преимуществ для изучения многих аспектов нейродегенерации благодаря их свойству плюрипотентности, способности к самообновлению и дифференцировке в различные типы клеток организма человека. В ходе работы нами получена и охарактеризована линия m10.7 ИПСК пациента с болезнью Паркинсона. Клетки линии m10.7 экспрессируют маркеры плюрипотентности OCT3/4, NANOG, SOX2, TRA-1-60 (рис. 1, a), а также способны давать производные трех зародышевых листков при спонтанной дифференцировке (рис. 1, b). Линия ИПСК m10.7 зарегистрирована в международном реестре плюрипотентных стволовых клеток человека hPSCreg под именем ICGi041-A (<https://hpscereg.eu/cell-line/ICGi041-A>, дата последнего доступа 31.07.2024).

В клетки полученной плюрипотентной линии m10.7 с помощью системы CRISPR/Cas9 внесен доксициклин-управляемый трансген альфа-синукле-

ина SNCA с эпитопами 3×FLAG и 2×Strep-Tag II, а также трансген трансактиватора M2rtTA, необходимого для управления экспрессией в системе TET-ON. Трансген химерного белка SNCA-C-3XFLAG-2XST интегрировали в локус *AAVS1* ИПСК пациента с болезнью Паркинсона путем гомологичной рекомбинации с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 [10]. Локус *AAVS1*, расположенный на хромосоме 19 человека, относится к локусам, имеющим условное название «safe harbor». Расположение трансгена в этом локусе обеспечивает его стабильную экспрессию (без влияния на неё эпигенетических модификаций) и не нарушает экспрессию других генов [11]. Отобрано 8 субклонов ИПСК, несущих указанные трансгены в локусе *AAVS1*. Экспрессия трансгена SNCA-C-3XFLAG-2XST в субклонах запускалась при добавлении в культуральную среду 2 мкг/мл доксицилина, что подтверждено количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Субклоны Sc1, Sc2, Sc9, Sc10 были направленно дифференцированы в дофаминергические нейроны. Экспрессия SNCA и химерного белка SNCA-C-3XFLAG-2XST в нейронах подтверждена с помощью Вестерн-блот-анализа (рис. 1, с).

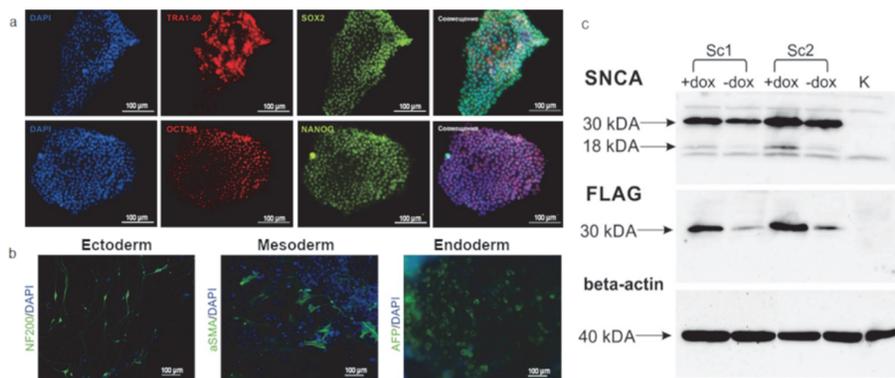


Рис. 1. Подтверждение плюрипотентного статуса линии ИПСК m10.7 с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания: *a* – экспрессия маркеров плюрипотентности SOX2, TRA-1-60, OCT3/4, NANOG, *b* – экспрессия маркеров производных трех зародышевых листков, полученных при спонтанной дифференцировке: NF200 (эктодерма), aSMA (мезодерма), AFP (энтодерма). Ядра окрашены DAPI. *c* – Вестерн-блот-анализ экспрессии альфа-синуклеина в нейронах, дифференцированных из субклонов (Sc1, Sc2, культивируемых в присутствии (+dox) или отсутствии (–dox) доксицилина) линии ИПСК m10.7, несущих доксицилин-управляемый трансген SNCA-C-3XFLAG-2XST в локусе *AAVS1*, с помощью антител против альфа-синуклеина (SNCA) и 3×FLAG-эпитопа (FLAG). В качестве референса использовали бета-актин (beta-actin). В качестве негативного контроля (K) использовались белковые экстракты из линии ИПСК здорового человека iMA-1L

[Fig. 1. Confirmation of the pluripotent status of the iPSC m10.7 line by immunofluorescence staining: *a* - Expression of pluripotency markers SOX2, TRA-1-60, OCT3/4, NANOG, *b* - expression of markers of derivatives of three germ layers obtained during spontaneous differentiation: NF200 (ectoderm), aSMA (mesoderm), AFP (endoderm). Nuclei are stained with DAPI. *c* - Western blot analysis of alpha-synuclein expression in neurons differentiated from subclones Sc1, Sc2 of the m10.7 iPSC line carrying the doxycycline-controlled transgene SNCA-C-3XFLAG-2XST at the *AAVS1* locus. Antibodies against alpha-synuclein (SNCA) and 3×FLAG epitope (FLAG) were used in the analysis, beta-actin was used as a reference. Protein extracts from the iMA-1L iPSC line of healthy human were used as a negative control (K)]

Антитела на альфа-синуклеин детектировали сигналы, соответствующие белкам с молекулярной массой 18 и 30 кДа. Молекулярная масса нативного белка альфа-синуклеина – 14,5 кДа, а суммарная молекулярная масса эпитопов 3×FLAG и 2×Strep tag II – около 3,5 кДа. Сигналы, соответствующие белкам молекулярной массы 18 кДа, довольно ярко детектируются в образцах клеток, культивировавшихся в присутствии доксициклина (Dox+), и соответствуют продукту, синтезированному с внесенного в геном клеток трансгена SNCA-C-3XFLAG-2XST. Наиболее яркие сигналы в районе 30 кДа, вероятно, соответствуют димерной форме альфа-синуклеина, которая может существовать в клетке в равновесии с мономерной формой [12]. Интересно, что белковые продукты молекулярной массой 30 кДа также обнаружены при использовании антител на 3×FLAG-эпитоп, что подтверждает способность химерного белка участвовать в димеризации. Наличие слабых сигналов, выявляемых антителами на 3×FLAG-эпитоп в образцах Dox–, свидетельствует о наличии базовой экспрессии трансгенов с индуцируемым промотором, что подтверждено как Вестерн-блот-анализом, так и количественной ПЦР. С помощью созданной уникальной системы можно детально исследовать межмолекулярные взаимодействия альфа-синуклеина, что позволит получить новые данные о молекулярно-генетических механизмах развития болезни Паркинсона и других синуклеинопатий, а также найти новые мишени для потенциальных лекарственных препаратов.

Заключение

В настоящей работе была создана уникальная клеточная модель протеинопатии, предназначенная для исследования межмолекулярных взаимодействий альфа-синуклеина, основанная на пациент-специфичных ИПСК. В полученных клеточных линиях происходит индукция экспрессии альфа-синуклеина, меченного 3×FLAG и 2×Strep-Tag II эпитопами. Наличие этих эпитопов не нарушает процессы димеризации альфа-синуклеина, а после манипуляций с геномным редактированием ИПСК сохраняют свой плюрипотентный статус. Полученная клеточная модель позволяет изучать механизмы влияния протеинопатии на жизнедеятельность нейронов, а также проводить скрининг и тестирование потенциальных лекарственных препаратов на релевантных типах клеток, полученных в результате дифференцировки ИПСК.

Список источников

1. Hartl F.U. Protein Misfolding Diseases // Annual review of biochemistry. 2017. Vol. 86. PP. 21–26. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044518
2. Poewe W., Seppi K., Tanner C.M., Halliday G.M., Brundin P., Volkman J., Schrag A.E., Lang A.E. Parkinson disease // Nature reviews. Disease primers. 2017. Vol. 3. 17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13
3. Burré J., Sharma M., & Südhof T.C. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein // Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2018. Vol. 8, № 3. a024091. doi: 10.1101/cshperspect.a024091

4. Gloeckner C.J., Boldt K., Schumacher A., Roepman R., Ueffing M. A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes // *Proteomics*. 2007. Vol. 7, № 23. PP. 4228–4234. doi: 10.1002/pmic.200700038
5. Malakhova A.A., Pavlova S.V., Grigor'eva E.V., Medvedev S.P., Minina J.M., Vyatkin Y.V., Khabarova E.A., Rzaev J.A., Kovalenko L.V., Zakian S.M. An Induced Pluripotent Stem Cell Line (ICGi023-A) Obtained from a Patient with Parkinson's Disease Associated Polymorphisms in LRRK2 and PINK1 Genes // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2023. Vol. 54. PP. 88–95. doi: 10.1134/S1062360423010071
6. Pavlova S.V., Valetdinova K.R., Malankhanova T.B., Polivtsev D.E., Malahova A.A., Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Zakian S.M., Medvedev S.P. Transgenic Lines of Human Induced Pluripotent Stem Cells ICGi022-A-6 and ICGi022-A-7 with Doxycycline-Inducible Variants of Programmable Nuclease AsCas12a // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2023. Vol. 54. PP. 374–386. doi: 10.1134/S1062360423060061
7. Патент № 2795156 Российская Федерация, МПК C12N 15/11 (2006.01), C12N 15/00 (2006.01), СПК C12N 15/00 (2023.02). Рекомбинантная плазмидная ДНК pSNCA-C-3XFLAG-2XST-donor, обеспечивающая стабильную доксициклин-управляемую экспрессию химерного белка альфа-синуклеина в культурах клеток человека: № 2022117570: заявл. 28.06.2022: опубл. 28.04.2023, Бюл. № 13/ Медведев С.П., Маляхова А.А., Коваленко Л.В., Закиан С.М.; заявитель ИЦиГ СО РАН, СурГУ. 18 с.: ил.
8. Oosterveen T., Garção P., Moles-Garcia E., Soleilhavoup C., Travaglio M., Sheraz S., Peltirini R., Patrick K., Labas V., Combes-Soia L., Marklund U., Hohenstein P., Panman L. Pluripotent stem cell derived dopaminergic subpopulations model the selective neuron degeneration in Parkinson's disease // *Stem Cell Reports*. 2021. Vol. 16, № 11. PP. 2718–2735. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.09.014
9. Li W., Chen S., Li J.Y. Human induced pluripotent stem cells in Parkinson's disease: A novel cell source of cell therapy and disease modeling // *Progress in neurobiology*. 2015. Vol. 134. PP. 161–77. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.009
10. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nature protocols*. 2013. Vol. 8, № 11. PP. 2281–2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143
11. DeKelver R.C., Choi V.M., Moehle E.A., Paschon D.E., Hockemeyer D., Meijings S.H., Sancak Y., Cui X., Steine E.J., Miller J.C., Tam P., Bartsevich V.V., Meng X., Rupniewski J., Gopalan S.M., Sun H.C., Pitz K.J., Rock J.M., Zhang L., Davis G.D., Rebar E.J., Cheeseman I.M., Yamamoto K.R., Sabatini D.M., Jaenisch R., Gregory P.D., Urnov F.D. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome // *Genome research*. 2010. Vol. 20 (8), PP. 1133–42. doi: 10.1101/gr.106773.110
12. Marmolino D., Foerch P., Atienzar F.A., Staelens L., Michel A., Scheller D. Alpha synuclein dimers and oligomers are increased in overexpressing conditions in vitro and in vivo // *Molecular and cellular neurosciences*. 2016. Vol. 71, PP. 92–101. doi: 10.1016/j.mcn.2015.12.012

References

1. Hartl FU. Protein Misfolding Diseases. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:21-26. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-044518
2. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, Schrag AE, Lang AE. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13
3. Burré J, Sharma M, Südhof TC. Cell Biology and Pathophysiology of α -Synuclein. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;8(3):a024091. doi: 10.1101/cshperspect.a024091
4. Gloeckner CJ, Boldt K, Schumacher A, Roepman R, Ueffing M. A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes. *Proteomics*. 2007;7(23):4228-4234. doi: 10.1002/pmic.200700038

5. Malakhova AA, Pavlova SV, Grigor'eva EV, Medvedev SP, Minina JM, Vyatkin YV, Khabarova EA, Rzaev JA, Kovalenko LV, Zakian SM. An Induced Pluripotent Stem Cell Line (ICGi023-A) Obtained from a Patient with Parkinson's Disease Associated Polymorphisms in LRRK2 and PINK1 Genes. *Russ J Dev Biol.* 2023;54:88-95. doi: 10.1134/S1062360423010071
6. Pavlova SV, Valetdinova KR, Malankhanova TB, Polivtsev DE, Malahova AA, Grigor'eva EV, Shevchenko AI, Zakian SM, Medvedev SP. Transgenic Lines of Human Induced Pluripotent Stem Cells ICGi022-A-6 and ICGi022-A-7 with Doxycycline-Inducible Variants of Programmable Nuclease AsCas12a. *Russ J Dev Biol.* 2023;54:374-386. doi: 10.1134/S1062360423060061
7. Patent N 2795156 Russian Federation, Int. Cl. C12N 15/11 (2006.01), C12N 15/00 (2006.01), C12N 15/00 (2023.02). Recombinant plasmid DNA pSN CAC-3X FLOW-2XST-donor, providing stable doxycycline-controlled expression of chimeric protein alpha-synuclein in human cell cultures: N 2022117570: register 28.06.2022: published 28.04.2023 / Medvedev SP, Malakhova AA, Kovalenko LV, Zakian SM; applicant ICG SB RAS, SurGU. 18 p.: fig. (In Russian).
8. Oosterveen T, Garção P, Moles-Garcia E, Soleilhavoup C, Travaglio M, Sheraz S, Peltrini R, Patrick K, Labas V, Combes-Soia L, Marklund U, Hohenstein P, Panman L. Pluripotent stem cell derived dopaminergic subpopulations model the selective neuron degeneration in Parkinson's disease. *Stem Cell Reports.* 2021;16(11):2718-2735. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.09.014
9. Li W, Chen S, Li JY. Human induced pluripotent stem cells in Parkinson's disease: A novel cell source of cell therapy and disease modeling. *Prog Neurobiol.* 2015;134:161-77. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.09.009
10. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143
11. DeKelver RC, Choi VM, Moehle EA, Paschon DE, Hockemeyer D, Meijsing SH, Sancak Y, Cui X, Steine EJ, Miller JC, Tam P, Bartsevich VV, Meng X, Rupniewski I, Gopalan SM, Sun HC, Pitz KJ, Rock JM, Zhang L, Davis GD, Rebar EJ, Cheeseman IM, Yamamoto KR, Sabatini DM, Jaenisch R, Gregory PD, Urnov FD. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res.* 2010;20(8):1133-42. doi: 10.1101/gr.106773.110
12. Marmolino D, Foerch P, Atienzar FA, Staelens L, Michel A, Scheller D. Alpha synuclein dimers and oligomers are increased in overexpressing conditions in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci.* 2016;71:92-101. doi: 10.1016/j.mcn.2015.12.012

Информация об авторах:

Малахова Анастасия Александровна, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, н.с. лаборатории геномных медицинских технологий ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1916-1333>

E-mail: amal@bionet.nsc.ru

Аллаярова Элина Равильевна, студентка НГУ, лаборант-исследователь ИЦиГ СО РАН (Новосибирск, Россия).

Шарипова Динара Витальевна, лаборант ИЦиГ СО РАН (2016-2019) (Новосибирск, Россия).

Павлова Софья Викторовна, канд. биол. наук, н.с. лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, с.н.с. лаборатории геномных медицинских технологий ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>

E-mail: spav@bionet.nsc.ru

Григорьева Елена Викторовна, канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, н.с. лаборатории геномных медицинских технологий ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>

E-mail: evlena@bionet.nsc.ru

Медведев Сергей Петрович, канд. биол. наук, в.н.с. лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, с.н.с. лаборатории геномных медицинских технологий ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>

E-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Закян Сурен Минасович, д-р биол. наук, зав. лабораторией эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН, г.н.с. лаборатории геномных медицинских технологий ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>

E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about the authors:

Anastasia A. Malakhova, Cand.Sci. (Biol.), Senior Researcher at the Laboratory of Developmental Epigenetics ICG SB RAS, Researcher at the Laboratory of Genomic Medical Technologies ICBFM SB RAS (Novosibirsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1916-1333>

E-mail: amal@bionet.nsc.ru

Elina R. Allayarova, student of NSU, research laboratory assistant at ICiG SB RAS (Novosibirsk, Russia).

Dinara V. Sharipova, laboratory assistant at ICiG SB RAS (2016-2019) (Novosibirsk, Russia).

Sophia V. Pavlova, Cand.Sci. (Biol.), Researcher at the Laboratory of Developmental Epigenetics ICG SB RAS, Senior Researcher at the Laboratory of Genomic Medical Technologies ICBFM SB RAS (Novosibirsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1095-3692>

E-mail: spav@bionet.nsc.ru

Elena V. Grigor'eva, Cand.Sci. (Biol.), Senior Researcher at the Laboratory of Developmental Epigenetics ICG SB RAS, Researcher at the Laboratory of Genomic Medical Technologies ICBFM SB RAS (Novosibirsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9162-9108>

E-mail: evlena@bionet.nsc.ru

Sergey P. Medvedev, Cand.Sci. (Biol.), Leading Researcher at the Laboratory of Developmental Epigenetics ICG SB RAS, Leading Researcher at the Laboratory of Genomic Medical Technologies ICBFM SB RAS (Novosibirsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1520-5549>

E-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

Suren M. Zakian, D.Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Developmental Epigenetics ICG SB RAS, Principal Investigator at the Laboratory of Genomic Medical Technologies ICBFM SB RAS (Novosibirsk, Russia).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2448-6511>

E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

The Authors declare no conflict of interest.

*Статья поступила в редакцию 01.08.2024;
одобрена после рецензирования 29.10.2024; принята к публикации 03.03.2025.*

*The article was submitted 01.08.2024;
approved after reviewing 29.10.2024; accepted for publication 03.03.2025.*