

УДК 616.8-056.7



## СОЗДАНИЕ КЛОНА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ С КОНДИЦИОННЫМ НОКАУТОМ ГУМАНИЗИРОВАННОГО ГЕНА *SNCA*

Е.А. Патраханов, В.М. Покровский, А.Ю. Карагодина, А.М. Краюшкина,  
Н.С. Жунусов, А.В. Дейкин, М.В. Корокин, М.В. Покровский, О.Б. Алтухова

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования  
«Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,  
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, д. 85

E-mail: mkorokin@mail.ru

Получена 10.09.2022

После рецензирования 01.11.2022

Принята к печати 20.11.2022

Одним из ключевых молекулярных звеньев в патогенезе болезни Паркинсона является белок  $\alpha$ -синуклеин. Накопленные данные свидетельствуют о том, что патогенные мутации в гене *Snca* ассоциированы с развитием нейродегенеративного повреждения головного мозга, тем самым указывая на актуальность изучения нейробиологической роли  $\alpha$ -синуклеина.

**Цель.** Создание генетически-модифицированного клона стволовых клеток мышей с кондиционным нокаутом гуманизированного  $\alpha$ -синуклеина, который может быть использован для реинъекции в мышинные бластоцисты, а также для фундаментальных и прикладных *in vitro* исследований в области патофизиологии и нейрофармакологии.

**Материалы и методы.** Для создания мышинных стволовых клеток с кондиционным нокаутом гуманизированного гена *Snca* был использован прежде полученный клон с фланкированными LoxP-сайтами первым экзоном *Snca*. Для гуманизации IV и V экзона была использована система CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации с донорными ДНК олигонуклеотидами человеческих сайтов соответствующих генов. Нуклеаза Cas9, гидовые РНК и донорная ДНК были трансфицированы в клетки мыши.

**Результаты.** Нами был предложен и реализован подход к получению клонов мышинных генетически-модифицированных стволовых клеток, экспрессирующих патологический гуманизированный  $\alpha$ -синуклеин. Полученные клоны были высеяны на чашки Петри для размножения и дальнейшего генетического анализа. Был обнаружен клон 126-2F4, несущий необходимые генетические модификации. Результаты проведенного исследования принципиально важны не только для понимания развития патологического процесса при  $\alpha$ -синуклеинопатиях, но и, что ещё важнее, для разработки новых терапевтических подходов, которые позволят остановить распространение агрегационной патологии человеческого  $\alpha$ -синуклеина по нервной системе и валидации этих подходов в доклинических испытаниях.

**Заключение.** В результате проведенного исследования разработана стратегия CRISPR/Cas9-ассистированной гомологичной рекомбинации в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши для создания полностью гуманизированного гена *Snca*, кодирующего  $\alpha$ -синуклеин. Выполнено редактирование генома клона эмбриональных стволовых клеток мыши с использованием CRISPR технологии. Синтезированы РНК и ДНК олигонуклеотиды, необходимые для создания рибонуклеопротеиновых комплексов, осуществляющих направленную гомологичную рекомбинацию в *Snca* локусе генома мыши. Разработанный клон клеток может служить для создания линии генетически-модифицированных мышей, служащих тест-системой для патофизиологических и нейрофармакологических исследований, связанных с синуклеинопатиями. При этом до индукции Cre-зависимой рекомбинации данная линия является репрезентативной моделью для исследования биологической роли мутантного *Snca*. В то же время, после Cre-зависимая активация нокаута позволяет имитировать фармакологическое ингибирование  $\alpha$ -синуклеина, что представляет особый интерес для прикладных исследований в нейрофармакологии.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -синуклеин; нейродегенерация; болезнь Паркинсона; кондиционный нокаут; CRISPR/Cas9

**Список сокращений:** НЗ – нейродегенеративные заболевания; оРНК – одиночная гидовая рибонуклеиновая кислота; РНП – рибонуклеопротеины; ПЦР – полимеразная цепная реакция; NAC – неамилоидный компонент; БП – болезнь Паркинсона.

**Для цитирования:** Е.А. Патраханов, В.М. Покровский, А.Ю. Карагодина, А.М. Краюшкина, Н.С. Жунусов, А.В. Дейкин, М.В. Корокин, М.В. Покровский, О.Б. Алтухова. Создание клона эмбриональных стволовых клеток мышей с кондиционным нокаутом гуманизированного гена *Snca*. *Фармация и фармакология*. 2022;10(6):525-535. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-525-535

© Е.А. Патраханов, В.М. Покровский, А.Ю. Карагодина, А.М. Краюшкина,  
Н.С. Жунусов, А.В. Дейкин, М.В. Корокин, М.В. Покровский, О.Б. Алтухова, 2022

**For citation:** E.A. Patrakhonov, V.M. Pokrovsky, A.Yu. Karagodina, A.M. Krayushkina, N.S. Zhunusov, A.V. Deykin, M.V. Korokin, M.V. Pokrovsky, O.B. Altukhova. Development of murine stem cells with conditional knockout of humanized *Snca* gene. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(6): 525-535. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-525-535

## DEVELOPMENT OF MURINE STEM CELLS WITH CONDITIONAL KNOCKOUT OF HUMANIZED *SNCA* GENE

E.A. Patrakhanov, V.M. Pokrovsky, A.Yu. Karagodina, A.M. Krayushkina,  
N.S. Zhunusov, A.V. Deykin, M.V. Korokin, M.V. Pokrovsky, O.B. Altukhova

Belgorod State National Research University,  
85, Pobedy Str., Belgorod, Russia, 308015

E-mail: mkorokin@mail.ru

Received 10 Sep 2022

After peer review 01 Nov 2022

Accepted 20 Nov 2022

$\alpha$ -synuclein is one of the key molecular links in the pathogenesis of Parkinson's disease. The accumulated data indicate that pathogenic mutations in the *Snc*a gene are associated with the development of neurodegenerative brain damage, indicating the relevance of studying the synuclein neurobiological role.

**The aim** of the study was to create a genetically modified clone of mouse stem cells with a conditional knockout of humanized  $\alpha$ -synuclein, which can be used for the reinjection into mouse blastocysts, as well as for basic and applied *in vitro* research in the field of pathophysiology and neuropharmacology.

**Materials and methods.** To create mouse stem cells with a conditional knockout of the humanized *Snc*a gene, a previously obtained clone with the first *Snc*a exon flanked by LoxP sites, was used. The CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination system with donor DNA oligonucleotides of the human sites of the corresponding gene sites was used to humanize the fourth and fifth exons. Cas9 nuclease, single guide RNA, and donor DNA were transfected into mouse cells.

**Results.** An approach to obtaining clones of mouse genetically modified stem cells expressing pathological humanized  $\alpha$ -synuclein, has been proposed and implemented. The resulting clones were plated on Petri dishes for propagation and a further genetic analysis. Clone 126-2F4 was found out carrying the necessary genetic modifications. The results obtained are fundamentally important not only for understanding the development of the pathological process in  $\alpha$ -synucleinopathies, but which is more important, for the development of new therapeutic approaches that will stop the extension of the human  $\alpha$ -synuclein aggregation pathology throughout the nervous system, and the validation of these approaches in preclinical trials.

**Conclusion.** As a result of the study, a strategy for CRISPR/Cas9-assisted homologous recombination in the genome of mouse embryonic stem cells has been developed to create a fully humanized *Snc*a gene encoding  $\alpha$ -synuclein, and the clone genome of mouse embryonic stem cells has been edited using a CRISPR technology. The RNA and DNA oligonucleotides necessary for the creation of RNP complexes that carry out a directed homologous recombination in the *Snc*a locus of the mouse genome have been synthesized. The developed cell clone can serve to create a line of genetically modified mice that serve as a test system for pathophysiological and neuropharmacological studies associated with synucleinopathies. Herewith, before the induction of the Cre-dependent recombination, this line is a representative model for studying a biological role of mutant *Snc*a. At the same time, after a Cre-dependent knockout activation, it is possible to imitate the pharmacological inhibition of  $\alpha$ -synuclein, which is of particular interest for applied research in neuropharmacology.

**Keywords:**  $\alpha$ -synuclein; neurodegeneration; Parkinson's disease; conditional knockout; CRISPR/Cas9

**Abbreviations:** NDs – neurodegenerative diseases; sgRNA – single-guide RNA; NAC – non-amyloid- $\beta$  component; RNP – ribonucleoprotein; PCR – polymerase chain reaction; PD – Parkinson's disease.

### ВВЕДЕНИЕ

Гетерогенная группа патологий, объединенная понятием нейродегенеративные заболевания (НЗ), продолжает приобретать все большую медицинскую и социальную значимость. Ввиду увеличения средней продолжительности жизни, бремя НЗ, классически ассоциированных с пожилым возрастом, становится одной из наиболее актуальных медико-биологических проблем [1]. При этом, несмотря на высокие темпы развития нейробиологии, многие аспекты патогенеза НЗ остаются раскрытыми лишь фрагментарно. Одним из подобных аспектов является роль  $\alpha$ -синуклеина в основных процессах, связанных с дегенеративной гибелью нейронов.

В качестве основного компонента белковых

агрегатов был обнаружен  $\alpha$ -синуклеин при целом ряде НЗ, которые объединены в группу синуклеинопатии, включая болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, расстройство поведения во сне с быстрыми движениями глаз и истинную вегетативную недостаточность [2].

Альфа-синуклеин является продуктом гена *Snc*a, расположенного на хромосоме 4 в положении q22.1 [3], и представляет собой небольшой белок (140 аминокислот), экспрессируемый преимущественно в нейронах, а также в некоторых опухолевых клетках [4]. Его структура представлена тремя основными доменами: N-концевой домен (1–60), содержащий консервативный мотив из нескольких повторяющихся последовательностей аминокислот

(консенсусная последовательность ХКТКЕГVXXXX); центральный домен (61–95), известный как неамилоидный компонент (NAC), который обладает высокой гидрофобностью и участвует в агрегации  $\alpha$ -синуклеина при образовании  $\beta$ -складчатой структуры; С-концевой домен (96–140), обогащенный отрицательно заряженными остатками и пролином, обеспечивающим гибкость полипептида [5].

Несмотря на то, что физиологическая функция  $\alpha$ -синуклеина остается малоизученной, его локализация в пресинаптических окончаниях [6], связь с резервным пулом синаптических пузырьков [7] и наблюдаемые недостатки синаптической передачи в ответ на нокаут или сверхэкспрессию гена предполагают, что  $\alpha$ -синуклеин играет роль в регуляции высвобождения нейротрансмиттеров, а также в нейропластичности [8].

Возможная роль  $\alpha$ -синуклеина в регуляции синаптического гомеостаза связана не только с его непосредственным взаимодействием с синаптическими везикулами: взаимодействует с синаптическими белками, контролирующими экзоцитоз везикул, такими как фосфолипаза D и семейство малых гуанозинтрифосфатаз Rab [9]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что  $\alpha$ -синуклеин может действовать как шаперон, контролировать деградацию и влиять на сборку, поддержание и распределение пресинаптического белкового комплекса SNARE, который участвует в высвобождении нейротрансмиттеров, в том числе дофамина [10]. В совокупности эти наблюдения указывают на то, что  $\alpha$ -синуклеин играет важную роль в перемещении и экзоцитозе везикул [8].

В данной работе мы описываем процедуру создания клона эмбриональных стволовых клеток мышей с CRISPR/Cas9-опосредованной гуманизацией гена *SncA* с фланкированным LoxP-сайтами первым экзоном.

**ЦЕЛЬ.** Создание генетически-модифицированного клона стволовых клеток мышей с кондиционным нокаутом гуманизированного  $\alpha$ -синуклеина, который может быть использован для реинъекции в мышинные бластоцисты, а также для фундаментальных и прикладных *in vitro* исследований в области патофизиологии и нейрофармакологии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Этическая экспертиза исследования

Эксперименты выполнены в НИИ фармакологии живых систем НИУ «БелГУ» с соблюдением этических стандартов, регламентируемых руководством ARRIVE. Экспериментальные исследования были одобрены биоэтической комиссией Белгородского государственного национального исследовательского университета (протокол № 08/21 от 08.02.2021).

### Получение клона клеток с фланкированным первым экзоном гена *SncA*

Клон мышинных эмбриональных стволовых клеток, несущих одинаково ориентированные LoxP-сайты, фланкирующие первый кодирующий экзон гена *SncA* (Клон 126), был получен в предыдущих исследованиях лаборатории и был использован для получения мышей с кондиционным нокаутом этого гена. Полученная линия мышей и доказательства истощения  $\alpha$ -синуклеина, кодируемого *SncA* геном, в нервной системе после индукции LoxP/Cre рекомбинации описаны в опубликованных статьях [11–13]. Клон был использован для дальнейшего геномного редактирования с целью получения стволовых клеток с гуманизированным геном *SncA*.

Поверхности всех пластиковых чашек Петри, флаконов и планшетов, использованных для культивирования мышинных эмбриональных стволовых клеток, были предварительно покрыты слоем желатина: 0,1% раствор желатина (Merk, Германия) наслаивали на рабочую поверхность пластика и отсасывали через 15–30 мин инкубации при комнатной температуре. Непосредственно после этого поверхность покрывали слоем культуральной среды.

Хранившиеся в жидком азоте клетки клона с фланкированным первым экзоном  $\alpha$ -синуклеина были разморожены, промыты средой ESGRO Complete Basal Medium (Sigma-Aldrich, США), ресуспендированы в 4 мл среды с GSK3 ингибитором ESGRO Complete Plus Clonal Grade Medium (Sigma-Aldrich, США) и высеяны на пластиковые чашки Петри диаметром 6 см (Nunc, Дания). Через 16 ч инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, меняли среду на свежую ESGRO Complete Plus Clonal Grade Medium, предварительно промыв чашки ESGRO Complete Basal Medium, а через 48 ч подсчитывали концентрацию клеток в камере Горяева и высевали 200 000 клеток на каждую из подготовленных пластиковых чашек Петри, используя ESGRO Complete Accutase (Merk, Германия).

### Подготовка клеток к нуклеофекции

Через 48 ч после посева обрабатывали клетки раствором Accutase, как описано выше, отбирали 2 аликвоты по 200 000 клеток, центрифугировали, тщательно удаляли супернатант и ресуспендировали каждый осадок в 20 мкл Complete P3 буфера, приготовленного непосредственно перед употреблением, смешивая 34,2 мкл Nucleofector TM Solution и 7,6 мкл P3 Primary Cell 4D-Nucleofector® X kit S (Lonza, Швейцария).

Для введения направленных разрывов в редактируемые области гена *SncA* были использованы рекомбинантный белок Cas9, одиночная гидовая рибонуклеиновая кислота (огРНК), а также одноцепочечные ДНК олигонуклеотиды

для гомологической рекомбинации, несущие нуклеотидные замены, соответствующие последовательности *Snca* гена человека.

Формировали рибонуклеопротеиновые (РНП) комплексы, смешивая 1 мкл 100  $\mu$ M раствора sgRNA4, 1 мкл 100  $\mu$ M раствора орPHK5 и 1 мкл 10 мг/мл раствора Cas9. Инкубировали 10 мин при 20°C, добавляли 0,4 мкл свежеприготовленной смеси растворов донорной ДНК (ssODN4 и ssODN5) с концентрацией 250  $\mu$ M для каждого из олигонуклеотидов и немедленно добавляли 20 мкл клеток ресуспендированных в Complete P3 буфере как описано выше.

Стратегия CRISPR/Cas9-ассистированной гомологической рекомбинации в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши для создания полностью гуманизированного гена *Snca*, экспрессирующего вариант  $\alpha$ -синуклеина человека с повышенной склонностью к агрегации, ассоциированной с развитием наследственной формы болезни Паркинсона показана на рисунках 1 и 5.

#### Доставка РНП комплексов в клетки с помощью нуклеофекции

Клеточную суспензию переносили в Nucleocuvette TM (Lonza, Швейцария) и проводили нуклеофекцию в приборе 4D-Nucleofector TM (Амаха, Украина), используя программу CA-120. По окончании переносили клетки в 5 мл ESGRO Complete Plus Clonal Grade Medium, ресуспендировали для получения моноклеточной суспензии, подсчитывали концентрацию выживших клеток в камере Горяева и высевали по 200, 400, 600, 800 и 1000 клеток на каждую из пяти подготовленных

чашек Петри диаметром 10 см в 10 мл той же среды предварительно отобрав аликвоту для выделения геномной ДНК.

Клетки дорастивали до появления отдельно лежащих колоний, происходящих из одной клетки, разделяли аккутазой в лунке 96-луночного планшета, инкубировали 3 мин при комнатной температуре, добавляли 0,2 мл ESGRO Complete Plus Clonal Grade Medium, ресуспендировали и растили клетки до достижения 30–50-процентного монослоя. На этом этапе пересевали клетки в ячейки 4-луночных чашек в триплетах. Последнюю из трёх параллельных чашек использовали для выделения геномной ДНК.

#### Выделение геномной ДНК и анализ редактирования экзонов гена *Snca*

Клетки лизировали непосредственно на поверхности лунок после удаления среды и выделяли ДНК с использованием кита Wizard Mammalian Cell DNA Extraction (Promega, США) согласно инструкции производителя. ДНК использовали для ПЦР амплификации фрагментов ДНК, содержащих последовательности экзонов гена *Snca* мыши, с помощью GenPak PCR Core набора (Isogen, Россия), согласно инструкции производителя.

Оценка наличия гомологической рекомбинации с донорной ДНК проводили с помощью аллель-специфичной ПЦР и рестрикционного анализа. Реакционную смесь инкубировали с рестрикционными эндонуклеазами специфичными к мутантной последовательности и электрофоретически разделяли для оценки наличия гомологической рекомбинации с донорной ДНК. Продукты реакции анализировали в 1,5% агарозном геле.

Таблица 1 – Компоненты смеси, трансфицированные в клон 126 эмбриональных стволовых клеток, для гуманизации мышинного гена *Snca*

Компонент	Последовательность	Вид молекулы
sgRNA4 (Alt® CRISPR-Cas9 sgRNA для гуманизации экзона IV гена <i>Snca</i> )	5'- mG*mU*mC*CUUCUUGACAAAGCCAGGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAG UUUAAAUAAGGCUAGUCGUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC mU*mU*mU*U -3'	PHK
sgRNA5 (Alt® CRISPR-Cas9 sgRNA для гуманизации экзона V гена <i>Snca</i> )	5'- mG*mG*mG*UGAGGAGGGUACCCACGUUUUAGAGCUArGAAAUAGCAAG UUUAAAUAAGGCUAGUCGUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC mU*mU*mU*U -3'	PHK
ssODN4 (Alt-RTM HDR Donor одноцепочечный олигонуклеотид для гуманизации экзона IV гена <i>Snca</i> )	5'- /Alt-R-HDR1/G*T*T ATT ACT GAG CAT AAA ACA GGC AGC CAT ACC TTG CCC AAC TGG TCC TTC TTG ACA AAG CCA GTT GCA GCA GCT ATG CTC CCA GCT CCC TCC ACT GTC TTC TGA GCG ACA GCT GTC* A*C/Alt-R-HDR2/ -3'	ДНК
ssODN5 (Alt-RTM HDR Donor одноцепочечный олигонуклеотид для гуманизации экзона V гена <i>Snca</i> )	5'- /Alt-R-HDR1/A*A*A ACA CTC TCT TAT TGT GCT TTC TCT TCC CTC TCT GTA GAA TGA GGA GGG GGC CCC ACA AGA AGG AAT CCT GGA AGA CAT GCC TGT GGA TCC TGA CAA TGA GGC TTA TGA AAT GCC TTC AGA GGT AAA TGC CTG TA*T* A/Alt-R-HDR2/ -3'	ДНК
Нуклеаза Cas9	–	Белок



**Последовательность нуклеотидов экзона IV фланкирующих областей *Snca* гена мыши**

Зелёный фон: экзон IV

Голубой фон: прямой праймер

Жёлтый фон: обратный праймер

Жирный шрифт: CRISPR-Cas9 crRNA и PAM последовательность (подчёркнута)

Красный шрифт: нуклеотиды, подлежащие замене для гуманизации экзона IV

```
TGTTATAATTAACCCCAATATTTTCTAATTTCTGCACTAAATTCATATTCAGTGTGGCTGAAACATGTCTCTTCTACCTGCTGTCTTG
TTCTTTCAGACTCCTGTACCTATGATATATGTGTCTATAGAAGTTGACAGCTGCTAGAAGTGAATATTAAAGTCTCTGTACACCATCAT
CTTTTACTCTGTTGTCACCTTGTATTTCTTAAGTGGCTGAGAAGACCAAAGAGCAAGTACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACTGGTGTG
V A E K T K E Q V T N V G G A V V T G V
ACAGCAGTCGCTCAGAAGACAGTGGAGGGAGCTGGGAATATAGCTGCTGCACTGGCTTTGTCAAGAAGGACCAGATGGGCAAGGTATGGCTG
T A V A Q K T V E G A G N I A A A T G F V K K D Q M G K
CCTGTTTTATGCTCAGTAATAACCCSTGGACACCATGTCCTTGCATGCATCATAGAGCATGCACATGATGCACACTGTGGGGAACACTGCCTTT
AAAGGGCTTTATTTTGTATGCACTGATGTCCTTGGGAAATGTCATGCACACAATAACCCSTGATTGTTTGTAGTTTCTGGAAGAAAGATATAGAA
```

**Последовательность нуклеотидов, гомологичная ssODN4 (Alt-R™ HDR Donor одноцепочечный олигонуклеотид для гуманизации экзона IV *Snca* гена)**

Курсив: «мисматч» праймер

Красный строчный шрифт: нуклеотидные замены, приводящие к гуманизации экзона IV или создающие новые сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами

```
ACAGCAGTCGCTCAGAAGACAGTGGAGGGAGCTGGGAATATAGCTGCTGCACTGGCTTTGTCAAGAAGGACCAGATGGGCAAGGTATGGCTG
PvuII
CCTGTTTTATGCTCAGTAATAAC
```

**Последовательность нуклеотидов экзона V и фланкирующих областей *Snca* гена мыши**

Зелёный фон: экзон V

Голубой фон: прямой праймер

Жёлтый фон: обратный праймер

Жирный шрифт: CRISPR-Cas9 crRNA и PAM последовательность (подчёркнута)

Красный шрифт: нуклеотиды, подлежащие замене для гуманизации экзона V

```
TAGATTGGTAACCCATGCATGCACAATGTTTTTCCAGTGGTTTGGTACACTTAGAATCCATCAATAATACAGAAGAAATGCACTTCTGATAAC
ACTTCGTGCAGCACCTTGAAGATAAGGTGTCTTTTTCAAGCTGGTTTTTCAGAAGTTAAAAACACTCTCTTATTGTGCTTTCTCTCCCTCTCTG
TAGGGTGGAGGGGTAACCCACAGGAAGGAATCCTGGAAGACATGCCTGTGGATCCTGGCAGTGGAGGCTTATGAAATGCCTTCAGAGTAAAT
G E E G Y P Q E G I L E D M P V D P G S E A Y E M P S E
GCCTGTATAAAGAAAACSTAAGCAAAACACTTTAGGTGTTAATTTGGAACACATACCATCAAAACCCCTGCCACTATCAGATCTCTCTCACATT
ATGGTTGGCATAGTTCAATCAAGAAAATATTTTAGAGCAAATGATTTTAACTTTTGTGGGAGAGGGTAAGGGATATAGTAGGTCAAAATTAAT
```

**Последовательность нуклеотидов ssODN4 (Alt-R™ HDR Donor одноцепочечный олигонуклеотид для гуманизации экзона V *Snca* гена)**

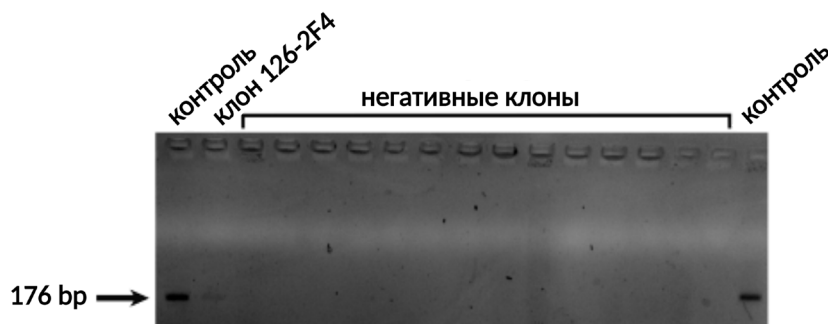
Курсив: «мисматч» праймер

Красный строчный шрифт: : нуклеотидные замены, приводящие к гуманизации экзона V или создающие новые сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами

```
AAAACACTCTCTTATTGTGCTTTCTCTTCCCTCTCTG
TAGGGTGGAGGGGTAACCCACAGGAAGGAATCCTGGAAGACATGCCTGTGGATCCTGGCAGTGGAGGCTTATGAAATGCCTTCAGAGTAAAT
AraI
GCCTGTATA
```

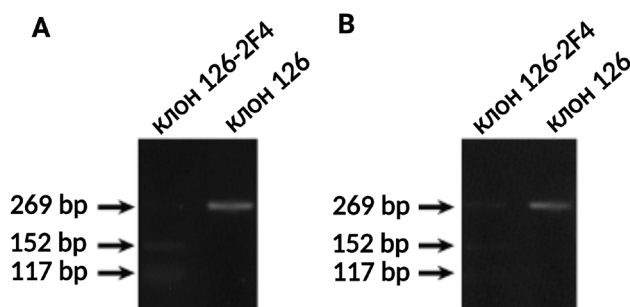
Рисунок 1 – Стратегия CRISPR/Cas9-ассистированной гомологической рекомбинации в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши для создания полностью гуманизованного гена *Snca*

Примечание: для некоторых праймеров и CRISPR-Cas9 crRNA показаны их позиции на приведённой цепи ДНК. Актуальные последовательности приведены в тексте.



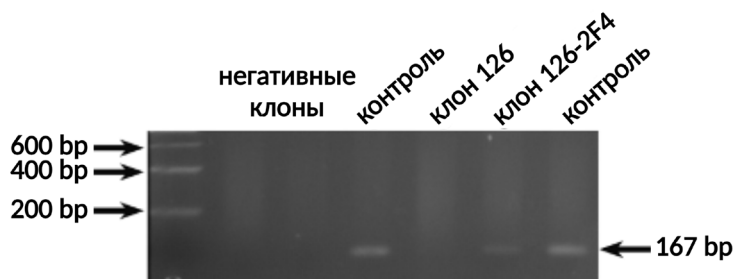
**Рисунок 2 – Анализ продуктов ПЦР амплификации ДНК проанализированных клонов после нуклеофекции клеток клона 126 эмбриональных стволовых клеток мыши РНП комплексами**

Примечание: амплификация 176- нуклеотидного фрагмента при использовании праймеров mexVfor-out и exV-rev-mism свидетельствует об успешной гомологической рекомбинации и, как следствие, гуманизации экзона V в геноме клеток субклона 126-2-F4. В качестве положительного контроля использовали амплификацию с теми же праймерами матрицы синтетического фрагмента, соответствующего гуманизированному экзону V мыши с фланкирующими последовательностями.



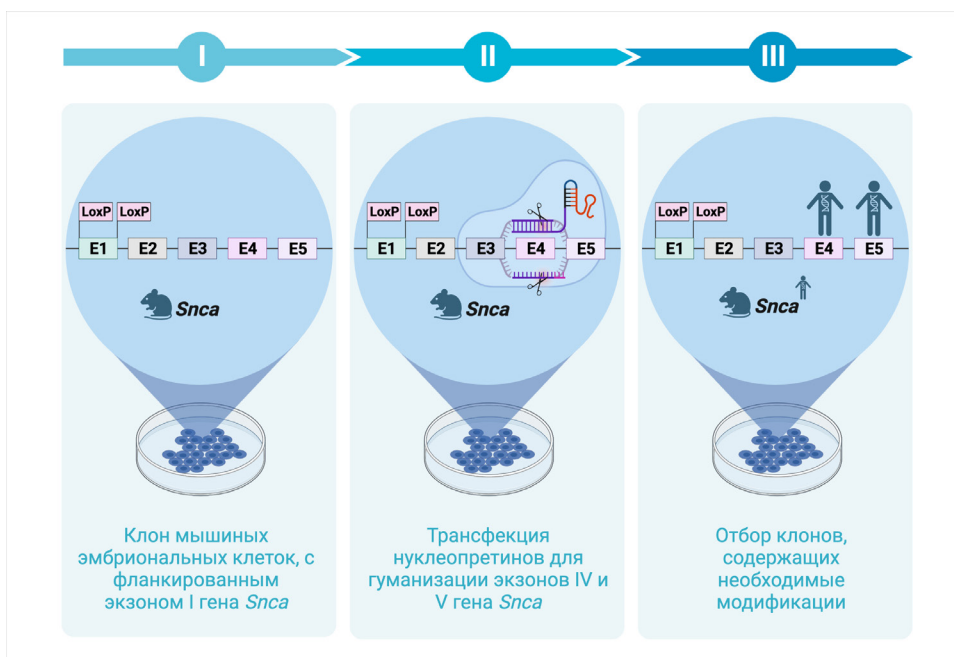
**Рисунок 3 – Анализ двух клонов, в которых при первичном скрининге была выявлена гомологическая рекомбинация в экзоне V гена *Snca*, с помощью обработки 269-нуклеотидного продукта ПЦР амплификации рестрикционной эндонуклеазой AclI**

Примечание: полное расщепление этого фрагмента на фрагменты размером 152 и 117 пар нуклеотидов свидетельствует о том, что клон 126-2-F4 является гомозиготным гуманизации экзона V (A), а только частичное расщепление в случае клона 126-3-B6 – о том, что в этом клоне была гуманизирована только одна из двух аллельных копий (B) гена *Snca*.



**Рисунок 4 – Анализ гуманизации экзона IV в геноме клеток клона 126-2-F4. ДНК материнского клона 126, клон 126-2-F4**

Примечание: в качестве положительного контроля использовали амплификацию с теми же праймерами с матрицы синтетического фрагмента, соответствующего гуманизированному экзону IV мыши с фланкирующими последовательностями. Выявление 167-нуклеотидного фрагмента при анализе ДНК клона 126-2-F4 свидетельствует о том, что в геноме клеток этого клона был гуманизирован экзон IV гена *Snca*.



**Рисунок 5 – Стратегия создания клона эмбриональных стволовых клеток мыши с кондиционным нокаутом гуманизированного гена *Snca***

Примечание: I – для создания клона эмбриональных стволовых клеток мыши с кондиционным нокаутом гуманизированного гена *Snca* были взяты клетки с фланкированным LoxP-сайтами первым экзоном *Snca*; II – путем трансфекции CRISPR/Cas9, гидовых РНК и фрагментов экзонов IV и V человеческого *Snca* для гомологичной репарации была произведена гуманизация мышиного гена *Snca*; III – после модификации методами аллель-специфичной ПЦР и рестрикционного анализа был проведен отбор клонов, несущих необходимую модификацию.

Список праймеров, использованных для ПЦР анализа гомологической рекомбинации в *Snca* локусе клеток клона 124 эмбриональных стволовых клеток мыши:

mexIV-for: 5'-GTCTCTGTACACCATCATC-3'  
 mexIV-rev: 5'-AGTGTGCATCATGTGCATGC-3'  
 exIV-rev-mism: 5'-CAGTaGCAGCAGCTATgc-3'  
 mexVfor-out: 5'-CCAGTGGTTTTGGTACACTTAG-3'  
 mexVfor-ins: 5'-CTGATAACACTTCGTGCAGC-3'  
 mexVrev-ins: 5'-TAGTGGCAGGGTTTTGATGG-3'  
 mexVrev-out: 5'-CTATGCCAACCATTAATGTGAG-3'  
 exV-rev-mism: 5'-tGTGGGgcCCCCTCCTCAtt-3'

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Первичный скрининг клонов на наличие гуманизированного экзона V

Для анализа на наличие 176-нуклеотидного продукта ПЦР амплификации при использовании праймеров mexVfor-out и exV-rev-mism после нуклеофекции, были отобраны 162 клона. Два 3'-концевых нуклеотида в exV-rev-mism соответствовали нуклеотидам, присутствующим в экзоне V гена *Snca* человека, в то время как в гене мыши в этих положениях находятся 2 других нуклеотида. Кроме указанных в 5'-концевой части этого праймера, имеются ещё 3 нуклеотида, характерные только для гена человека. Таким образом, продукт амплификации с этим праймером образуется только тогда, когда матрицей является ДНК человека или гуманизированная по этому гену ДНК мыши. Когда

же матрицей является нативная ДНК мыши, никаких продуктов амплификации не образуется. Пример такого анализа продуктов ПЦР амплификации ДНК, выделенной из клеток 15 отобранных клонов, приведён на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, один из 15 клонов, проверенных на наличие 176-нуклеотидного продукта ПЦР амплификации, дал положительный результат, т.е. в ДНК клеток этого клона произошла гомологическая рекомбинация в экзоне V, что являлось свидетельством того, что в клоне, обозначенном 126-2-F4, в соответствии с его положением в лунке одного из начальных 96-луночных планшетов, этот экзон оказался гуманизированным.

### Проверка на гомозиготность модификации в клоне 126-2-F4

ДНК клона 126-2-F4 и материнского клона 126 амплифицировали, используя праймера mexVfor-ins и mexVrev-ins, соответствующие последовательностям, фланкирующим экзон V мыши. Как и предполагалось, в обоих случаях выявлялся одинаковый продукт амплификации – 269-нуклеотидный фрагмент. Обработка реакционной смеси рестрикционной эндонуклеазой *ApaI* не приводила к расщеплению фрагмента амплифицированного с матрицы ДНК материнского клона 126, т.к. в геноме мыши в анализируемой области отсутствует сайт узнавания этим ферментом. Однако точечные замены, использованные при гуманизации экзона V,

приводили к появлению такого сайта. Фрагмент, амплифицированный с матрицы ДНК клона 126-2-F4 разрезался рестрикционной эндонуклеазой *ApaI* на 152-нуклеотидный и 117-нуклеотидный фрагменты (Рис. 3А). Важно отметить, что при этом оригинальный 269-нуклеотидный фрагмент полностью исчезал, что свидетельствовало о том, что в геноме клеток клона 126-2-F4 гомологическая рекомбинация и, следовательно, гуманизация экзона V произошла в обоих аллелях гена *Snca*. Ещё в одном клоне 126-3-B9, отобранном в первичном скрининге, наблюдалось лишь частичное расщепление 269-нуклеотидного фрагмента рестрикционной эндонуклеазой *ApaI* (Рис. 3Б), что свидетельствовало о том, что в геноме этого клона гомологическая рекомбинация произошла только в одной аллельной копии гена или то, что этот клон произошёл не из одной, а из двух клеток, в геноме одной из которых не произошло редактирование последовательностей ДНК экзона V.

#### Проверка наличия гуманизированного экзона IV в геноме клеток клона 126-2-F4

ДНК клонов 126-2-F4, материнского клона 126 и двух негативных клонов из описанного выше скрининга амплифицировали, используя праймеры *texIV-for* и *exIV-rev-mism*. В качестве положительного контроля использовали амплификацию с теми же праймерами матрицы синтетического фрагмента, соответствующего гуманизированному экзону IV мыши с фланкирующими последовательностями. Результат анализа продуктов ПЦР амплификации приведён на рисунке 4.

Фрагмент ожидаемого размера (167 пар нуклеотидов) был выявлен только тогда, когда в качестве матрицы использовали ДНК клеток клона 126-2-F4, что свидетельствовало о том, что в этом клоне произошла гомологическая рекомбинация и в экзоне IV гена *Snca* мыши. Проверка на гомозиготность модификации этого экзона проводилась по той же схеме, что использовалась для экзона V с применением праймера *texIV-for* и *texIV-rev* и обработку продуктов амплификации рестрикционной эндонуклеазой *PvuII*. Было выявлено, что 280-нуклеотидный фрагмент, продукт ПЦР амплификации ДНК клеток клона 126-2-F4, полностью разрезался этим ферментом на фрагменты размером 164 и 116 пар нуклеотидов (Рис. 4), что свидетельствует о том, что в геноме клеток клона 126-2-F4 гомологическая рекомбинация и, следовательно, гуманизация экзона IV произошла в обоих аллелях гена *Snca*. Как и ожидалось, при отсутствии сайта узнавания *PvuII* в исследуемом фрагменте генома мыши, 280-нуклеотидный продукт ПЦР амплификации ДНК клеток материнского клона 126 не расщеплялся этим ферментом. Частичное расщепление было отмечено для 280-нуклеотидного продукта ПЦР амплификации ДНК клеток клона 126-3-B9, что свидетельствует в пользу сделанного

ранее предположения, что это клон произошёл не из одной, а из двух клеток.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с прогрессирующим старением популяции, заболеваемость и распространённость болезни Паркинсона (БП) значительно увеличились и будут продолжать расти – таким образом, это серьёзная медико-социальная проблема. Поиск эффективных терапевтических подходов требует использования оптимальных моделей развития патологического процесса при спорадической форме (~90% случаев) БП. Модели, используемые в настоящее время, не соответствуют этой задаче (не гуманизированы или некорректно гуманизированы, отсутствует возможность регуляции) и не могут быть использованы в экспериментальной нейрофармакологии.

Важнейшая роль  $\alpha$ -синуклеина в дегенеративной гибели клеток была показана при целом спектре нейродегенеративных заболеваний. Более того, мутации (A53T и A30P) были одними из первых обнаруженных генетических коррелятов болезни [14, 15]. Эта находка интенсифицировала изучение молекулярных механизмов  $\alpha$ -синуклеин-индуцированной нейропатологии. В настоящее время известно, что при патологических условиях  $\alpha$ -синуклеин склонен к образованию структур, богатых  $\beta$ -складками, включая олигомеры, протофибриллы и нерастворимые фибриллы, которые в конечном итоге накапливаются, образуя тельца Леви. Хотя заболевание традиционно связывается с нерастворимыми формами агрегированного  $\alpha$ -синуклеина, именно растворимые промежуточные олигомеры характеризуются нейротоксичными эффектами. Было обнаружено, что олигомеры опосредуют aberrантный кальциевый сигналинг, перекисное окисление липидов, оксидативный стресс, митохондриальную дисфункцию и гибель нейронов [16–18]. В *in vivo* исследованиях было продемонстрировано, что формы  $\alpha$ -синуклеина, склонные к образованию олигомеров и ингибирующие образование фибрилл, приводят к гибели дофаминергических нейронов. Напротив, формы, образующие фибриллы, не приводят к потере этих нейронов [19].

В целом, молекулярные каскады, связанные с aberrантной функцией  $\alpha$ -синуклеина, продолжают оставаться важнейшей темой изучения для современной нейробиологии [20, 21].

В этой связи, нами был предложен и реализован подход к получению генетически-модифицированных мышей, экспрессирующих патологический гуманизированный  $\alpha$ -синуклеин. Для получения данной линии мы использовали стратегию создания генетически-модифицированных животных через CRISPR/Cas9-опосредованное редактирование эмбриональных стволовых клеток. Полученный клон стволовых клеток может быть использован



для реинъекции в бластоцисты, которые затем будут трансплантированы мышам реципиентам для вынашивания генетически-измененных эмбрионов.

Описанная в данной работе генетическая модель позволяет проводить исследования, направленные на прецизионную оценку роли патологического  $\alpha$ -синуклеина у мышей.

Так, гуманизация экзонов IV и V позволит оценить фенотипические эффекты патогенного человеческого  $\alpha$ -синуклеина на репрезентативной тест-системе. Кроме того, наличие LoxP-сайтов, фланкирующих первый экзон, позволяют осуществлять пространственный и временной контроль экспрессии гуманизированного *Snca* за счет возможности Cre-индуцированного нокаута гена. Данная особенность позволяет прецизионно изучать эффекты тканеспецифичного нарушения экспрессии белка, предоставляя информацию о его роли в конкретной популяции клеток [22–25]. Более того, возможность индуцирования нокаута во взрослом возрасте позволяет исключить эффект антенатальной адаптации к генетической модификации.

Cre-зависимая индукция нокаута подразумевает, что скрещивание линии, содержащей фланкированный LoxP-сайтами участок гена, с трансгенными животными экспрессирующими Cre-рекомбиназу, приводит к удалению данного участка и утрате функциональной активности гена [18]. На сегодняшний день репертуар Cre-мышей характеризуется огромным разнообразием и отличие между разными штаммами заключается в тканеспецифичности экспрессии рекомбиназы. Более того, существуют линии, в которых проникновение Cre-рекомбиназы в ядро и, соответственно, ее активность зависят от тамоксифена. У данного типа мышей, сайт-специфическая рекомбинация между двумя LoxP-сайтами происходит только после обработки тамоксифеном, что позволяет регулировать экспрессию гена во времени [19].

Параллельно с созданием генетически-модифицированного клона эмбриональных стволовых клеток нашим коллективом также реализуется подход с прямым редактированием мышиных blastocyt. Иными словами, смесь, содержащая ДНК матрицу для гомологичной рекомбинации, мРНК Cas9 и гидовые РНК была микроинъектирована в оплодотворенные яйцеклетки мышей линии C57BL/6J. После 24 ч инкубации выжившие эмбрионы были трансплантированы в яйцеводы самок-реципиентов, которые служили

суррогатными матерями для мутантов. В настоящее время, подобным способом уже было получено первичное потомство мутантных мышей, которое проходит генетический анализ на наличие желаемых нуклеотидных замен.

Полученные результаты принципиально важны не только для понимания развития патологического процесса при альфа-синуклеинопатиях, но и, что еще важнее, для разработки новых терапевтических подходов, которые позволят остановить распространение агрегационной патологии человеческого  $\alpha$ -синуклеина по нервной системе, и валидации этих подходов в доклинических испытаниях.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования разработана стратегия CRISPR/Cas9-ассистированной гомологической рекомбинации в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши для создания полностью гуманизированного гена *Snca*, кодирующего  $\alpha$ -синуклеин и выполнено редактирование генома клон эмбриональных стволовых клеток мыши с использованием CRISPR технологии.

Синтезированы РНК и ДНК олигонуклеотиды, необходимые для создания РНП комплексов, осуществляющих направленную гомологическую рекомбинацию в *Snca* локусе генома мыши.

Скрининг клонов, полученных в результате нуклеофекции клеток материнского клон 126 эмбриональных стволовых клеток мыши созданными РНП комплексами, позволил идентифицировать клон 126-2-F4, отвечающий первичным критериям успешной гуманизации обеих аллелей эндогенного гена *Snca* в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши.

Таким образом, разработанный клон клеток может служить для создания линии генетически-модифицированных мышей, служащих тест-системой для патофизиологических и нейрофармакологических исследований, связанных с синуклеинопатиями. При этом до индукции Cre-зависимой рекомбинации данная линия является репрезентативной моделью для исследования биологической роли мутантного *Snca*. В то же время, после Cre-зависимая активация нокаута позволяет имитировать фармакологическое ингибирование  $\alpha$ -синуклеина, что представляет особый интерес для прикладных исследований в нейрофармакологии.

### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование проведено при финансовой поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации (Приложение № 9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Патраханов – выделение ДНК, ПЦР-анализ, рестрикционный анализ, написание статьи;  
 В.М. Покровский – написание статьи, культивирование клеток и нуклеофекция; А.Ю. Карагодина –  
 формализация списка литературы, подготовка графического материала; А.М. Краюшкина – формализация  
 списка литературы, подготовка графического материала; Н.С. Жунусов – ПЦР-анализ, написание статьи;  
 А.В. Дейкин – консультация по вопросам методологии исследования; М.В. Корокин – консультация по  
 вопросам методологии исследования, дизайн эксперимента; М.В. Покровский – консультация по вопросам  
 методологии исследования, дизайн эксперимента; Алтухова О.Б. – дизайн эксперимента, написание статьи.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Checkoway H., Lundin J.I., Kelada S.N. Neurodegenerative diseases // IARC Sci. Publ. – 2011. – P. 407–419.
2. Bougea A. Synuclein in neurodegeneration // Adv. Clin. Chem. – 2021. – Vol. 103. – P. 97–134. DOI: 10.1016/bs.acc.2020.08.007
3. Ozansoy M., Başak A.N. The central theme of Parkinson's disease:  $\alpha$ -synuclein // Mol Neurobiol. – 2013. – Vol. 47, No. 2. – P. 460–465. DOI: 10.1007/s12035-012-8369-3
4. George J.M. The synucleins // Genome Biol. – 2002. – Vol. 3, No. 1. – Art. ID: 3002. DOI: 10.1186/gb-2001-3-1-reviews3002
5. Breydo L., Wu J.W., Uversky V.N. A-synuclein misfolding and Parkinson's disease // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 1822, No. 2. – P. 261–285. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.10.002
6. Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M., Ge N., Flanagan L., de Silva H.A., Kittel A., Saitoh T. The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system // Neuron. – 1995. – Vol. 14, No. 2. – P. 467–475. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90302-x
7. Lee S.J., Jeon H., Kandror K.V. Alpha-synuclein is localized in a subpopulation of rat brain synaptic vesicles // Acta Neurobiol. Exp. (Wars). – 2008. – Vol. 68, No. 4. – P. 509–515.
8. Lashuel H.A., Overk C.R., Oueslati A., Masliah E. The many faces of  $\alpha$ -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target // Nat. Rev. Neurosci. – 2013. – Vol. 14, No. 1. – P. 38–48. DOI: 10.1038/nrn3406
9. Dalfó E., Ferrer I. Alpha-synuclein binding to rab3a in multiple system atrophy // Neurosci. Lett. – 2005. – Vol. 380, No. 1–2. – P. 170–175. DOI: 10.1016/j.neulet.2005.01.034
10. Burré J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherton M.R., Südhof T.C. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro* // Science. – 2010. – Vol. 329, No. 5999. – P. 1663–1667. DOI: 10.1126/science.1195227
11. Ninkina N., Connor-Robson N., Ustyugov A.A., Tarasova T.V., Shelkownikova T.A., Buchman V.L. A novel resource for studying function and dysfunction of  $\alpha$ -synuclein: mouse lines for modulation of endogenous Snca gene expression // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – Art. ID: 16615. DOI: 10.1038/srep16615
12. Roman A.Y., Limorenko G., Ustyugov A.A., Tarasova T.V., Lysikova E.A., Buchman V.L., Ninkina N. Generation of mouse lines with conditionally or constitutively inactivated Snca gene and Rosa26-stop-lacZ reporter located in cis on the mouse chromosome 6 // Transgenic Res. – 2017. – Vol. 26, No. 2. – P. 301–307. DOI: 10.1007/s11248-016-9995-8
13. Chaprov K.D., Lysikova E.A., Teterina E.V., Buchman V.L. Kinetics of alpha-synuclein depletion in three brain regions following conditional pan-neuronal inactivation of the encoding gene (Snca) by tamoxifen-induced Cre-recombination in adult mice // Transgenic Res. – 2021. – Vol. 30, No. 6. – P. 867–873. DOI: 10.1007/s11248-021-00286-3
14. Krüger R., Kuhn W., Müller T., Voitalla D., Graeber M., Kösel S., Przuntek H., Epplen J.T., Schöls L., Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease // Nat. Genet. – 1998. – Vol. 18, No. 2. – P. 106–108. DOI: 10.1038/ng0298-106
15. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease // Science. – 1997. – Vol. 276, No. 5321. – P. 2045–2047. DOI: 10.1126/science.276.5321.2045
16. Angelova P.R., Choi M.L., Berezhnov A.V., Horrocks M.H., Hughes C.D., De S., Rodrigues M., Yapom R., Little D., Dolt K.S., Kunath T., Devine M.J., Gissen P., Shchepinov M.S., Sylantsev S., Pavlov E.V., Klenerman D., Abramov A.Y., Gandhi S. Alpha synuclein aggregation drives ferroptosis: an interplay of iron, calcium and lipid peroxidation // Cell Death Differ. – 2020. – Vol. 27, No. 10. – P. 2781–2796. DOI: 10.1038/s41418-020-0542-z
17. Angelova P.R., Horrocks M.H., Klenerman D., Gandhi S., Abramov A.Y., Shchepinov M.S. Lipid peroxidation is essential for  $\alpha$ -synuclein-induced cell death // J. Neurochem. – 2015. – Vol. 133, No. 4. – P. 582–589. DOI: 10.1111/jnc.13024
18. Choi M.L., Chappard A., Singh B.P., Maclachlan C., Rodrigues M., Fedotova E.I., Berezhnov A.V., De S., Peddie C.J., Athauda D., Viridi G.S., Zhang W., Evans J.R., Wernick A.I., Zanjani Z.S., Angelova P.R., Esteras N., Vinokurov A.Y., Morris K., Jeacock K., Tosatto L., Little D., Gissen P., Clarke D.J., Kunath T., Collinson L., Klenerman D., Abramov A.Y., Horrocks M.H., Gandhi S. Pathological structural conversion of  $\alpha$ -synuclein at the mitochondria induces neuronal toxicity // Nat. Neurosci. – 2022. – Vol. 25, No. 9. – P. 1134–1148. DOI: 10.1038/s41593-022-01140-3. Erratum in: Nat. Neurosci. – 2022. – Vol. 25, No. 11. – Art. ID: 1582.
19. Choi M.L., Gandhi S. Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases // FEBS J. – 2018. – Vol. 285, No. 19. – P. 3631–3644. DOI: 10.1111/febs.14587
20. Srinivasan E., Chandrasekhar G., Chandrasekar P., Anbarasu K., Vickram A.S., Karunakaran R., Rajasekaran R., Srikumar P.S. Alpha-Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease // Front. Med. (Lausanne). – 2021. – Vol. 8. – Art. ID: 736978. DOI: 10.3389/fmed.2021.736978

21. Chaprov K.D., Goloborshcheva V.V., Tarasova T.V., Teterina E.V., Korokin M.V., Soldatov V.O., Pokrovskiy M.V., Kucheryanu V.G., Morozov S.G., Ovchinnikov R.K. Increased Expression of the Multimerin-1 Gene in  $\alpha$ -Synuclein Knockout Mice // *Dokl. Biol. Sci.* – 2020. – Vol. 494, No. 1. – P. 260–263. DOI: 10.1134/S0012496620050014
22. Soldatov V.O., Kubekina M.V., Silaeva Yu.Yu., Bruter A.V., Deykin A.V. On the way from SARS-CoV-sensitive mice to murine COVID-19 model // *Research Results in Pharmacology.* – 2022. – Vol. 6, No. 2. – P. 1–7. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.53633
23. Bruter A.V., Korshunova D.S., Kubekina M.V., Sergiev P.V., Kalinina A.A., Ilchuk L.A., Silaeva Y.Y., Korshunov E.N., Soldatov V.O., Deykin A.V. Novel transgenic mice with Cre-dependent co-expression of GFP and human ACE2: a safe tool for study of COVID-19 pathogenesis. *Transgenic Res.* 2021 Apr 14;30(3):289–301. DOI: 10.1007/s11248-021-00249-8. Epub ahead of print.
24. Кузубова Е.В., Радченко А.И., Покровский В.М., Патраханов Е.А., Новикова А.А., Степенко Ю.В., Дейкин А.В. Патологические состояния, ассоциированные с белком тау: механизмы развития и возможные биологические мишени для фармакологической коррекции тау-протеинопатии (обзор) // *Научные результаты биомедицинских исследований.* – 2022. – Т. 8, № 4. – С. 474–797. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-4-0-6
25. Dolskiy A.A., Gudymo A.S., Taranov O.S., Grishchenko I.V., Shitik E.M., Prokopov D.Y., Soldatov V.O., Sobolevskaya E.V., Bodnev S.A., Danilchenko N.V., Moiseeva A.A., Torzhkova P.Y., Bulanovich Y.A., Onhonova G.S., Ivleva E.K., Kubekina M.V., Belykh A.E., Tregubchak T.V., Ryzhikov A.B., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Deykin A.V., Yudkin D.V. The Tissue Distribution of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice With Inducible Ubiquitous Expression of hACE2 // *Front. Mol. Biosci.* – 2022. – Vol. 8. – Art. ID: 821506. DOI: 10.3389/fmolb.2021.821506

## АВТОРЫ

**Патраханов Евгений Александрович** – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-8415-4562. E-mail: pateval7@mail.ru

**Покровский Владимир Михайлович** – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0003-3138-2075. E-mail: vmpokrovsky08@gmail.com

**Карагодина Анастасия Юрьевна** – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0001-9440-5866. E-mail: karagodina75@gmail.com

**Краюшкина Анастасия Михайловна** – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-6830-3820. E-mail: annkrayushkina98@gmail.com

**Жунусов Никита Сергеевич** – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-1969-3615. E-mail: nzhunu@mail.ru

**Дейкин Алексей Васильевич** – кандидат биологических наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0001-9960-0863. E-mail: deykin@bsu.edu.ru

**Корокин Михаил Викторович** – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0001-5402-0697. E-mail: mkorokin@mail.ru

**Покровский Михаил Владимирович** – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, руководитель НИИ Фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0003-4478-1091. E-mail: mpokrovsky@yandex.ru

**Алтухова Оксана Борисовна** – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии медицинского института ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0003-4674-8797. E-mail: altuhova\_o@bsu.edu.ru