

Пептидные ингибиторы агрегации альфа-синуклеина

М.С. Юдин^{1,2}, А.М. Варижук¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия;

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

АННОТАЦИЯ

Маркёром синуклеинопатий, таких как болезнь Паркинсона, является агрегация регулятора динамики пресинаптических везикул — альфа-синуклеина. Наличие мутаций в центральном фрагменте и ряд иных факторов повышают риск олигомеризации альфа-синуклеина с образованием аморфных агрегатов и кросс-бета-структур амилоидного типа — фибрилл, которые проявляют выраженную нейротоксичность. Их структура стабилизирована внутримолекулярными контактами бета-тяжей из N-концевого и центрального участков альфа-синуклеина. Известно, что аффинные к этим участкам пептиды способны блокировать межмолекулярные контакты, характерные для патогенной конформации альфа-синуклеина, и предотвращать его агрегацию. Такие пептиды являются потенциальными нейропротекторами и могут найти применение в терапии болезни Паркинсона и других синуклеинопатий. В течение последних нескольких лет было получены десятки перспективных пептидов — блокаторов агрегации альфа-синуклеина. Протекторное действие нескольких пептидов-лидеров подтверждено на животных моделях болезни Паркинсона, однако ввиду проблем внутриклеточной доставки поиск альтернатив из числа проникающих пептидов остаётся актуальной задачей.

В данном обзоре рассмотрены ключевые стратегии рационального дизайна пептидных ингибиторов агрегации альфа-синуклеина и подходы к их тестированию, а также обобщены данные по механизму действия наиболее полно охарактеризованных эффективных ингибиторов.

Ключевые слова: альфа-синуклеин; синуклеинопатия; болезнь Паркинсона; пептид; пептидный ингибитор.

Как цитировать:

Юдин М.С., Варижук А.М. Пептидные ингибиторы агрегации альфа-синуклеина // Гены и клетки. 2026. Т. 21, № 2. С. XX–XX. DOI: 10.17816/gc695858 EDN: GPKRZZ

Рукопись получена: 06.11.2025 **Рукопись одобрена:** 24.02.2026 **Опубликована online:** 29.04.2026

Статья доступна по лицензии CC BY-NC-ND 4.0 International

© Эко-Вектор, 2026

Peptide Inhibitors of Alpha-Synuclein Aggregation

Mikhail S. Iudin^{1,2}, Anna M. Varizhuk¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia;

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

ABSTRACT

A hallmark of synucleinopathies, including Parkinson disease, is the aggregation of alpha-synuclein, a regulatory protein that modulates presynaptic vesicle dynamics. Mutations in the central fragment and several other factors increase the risk of alpha-synuclein oligomerization, leading to the formation of amorphous aggregates and cross-beta amyloid-type structures (fibrils) that exhibit pronounced neurotoxicity. Their structure is stabilized by intramolecular contacts of beta-strands from the N-terminal and central regions of alpha-synuclein. Peptides that exhibit affinity for these regions have been shown to block the intermolecular contacts characteristic of the pathogenic conformation of alpha-synuclein and thereby prevent its aggregation. Such peptides are potential neuroprotectors and may find application in the treatment of Parkinson disease and other synucleinopathies. In recent years, dozens of promising peptides that block alpha-synuclein aggregation have been identified. The protective effect of several leading peptides has been confirmed in animal models of Parkinson disease; however, due to intracellular delivery challenges, the search for alternative cell-penetrating peptides remains a pressing task. This review examines key strategies for the rational design of peptide inhibitors of alpha-synuclein aggregation and approaches to their testing, and summarizes data on the mechanism of action of the most fully characterized effective inhibitors.

Keywords: alpha-synuclein; synucleinopathy; Parkinson disease; peptide; peptide

To cite this article:

Iudin MS, Varizhuk AM. Peptide inhibitors of alpha-synuclein aggregation. *Genes & cells*. 2026;21(2):XX–XX. DOI: 10.17816/gc695858 EDN: GPKRZZ

Submitted: 06.11.2025 **Accepted:** 24.02.2026 **Published online:** 29.04.2026

Article can be used under the CC BY-NC-ND 4.0 International License

© Eco-Vector, 2026

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание протеостаза лежит в основе предотвращения заболеваний, ассоциированных с изменением фазового состояния белков, а именно с их переходом из функциональной растворимой формы в нейротоксичные белковые агрегаты (амилоидные кросс-бета-фибриллы) [1]. Подобные заболевания известны как протеинопатии [2]. Среди них особое место занимают синуклеинопатии, к которым относятся болезнь Паркинсона (БП), деменция с тельцами Леви, множественная системная атрофия, PLA2G6-ассоциированная нейродегенерация, POLG-ассоциированная нейродегенерация, болезнь Краббе, множественные системные атрофии. Все эти заболевания характеризуются агрегацией регулятора синаптической передачи — альфа-синуклеина (α Syn) [3, 4]. Причинами могут быть мультипликация гена α Syn, мутации в нём, нарушения посттрансляционных модификаций белка либо изменение его микроокружения за счёт мутаций в генах регуляторов нейровоспаления, метаболизма гликолипидов и лизосомальной активности [5, 6]. Проявления заболеваний включают нарушения когнитивных функций и/или двигательной активности, сенсорные аномалии и др. [7]. В случае БП симптоматика обусловлена дегенерацией экспрессирующих α Syn дофаминергических нейронов чёрной субстанции и отчасти — норадренергических нейронов голубого пятна [8].

Для терапии наследуемых форм синуклеинопатий, обусловленных мутациями [9], разрабатываются генотерапевтические подходы, однако их нельзя назвать универсальными. То же касается прототипов иммунотерапевтических препаратов для терапии БП, которые включают полипептидные вакцины и моноклональные антитела, активирующие элиминацию агрегатов α Syn. Ввиду повышенной проницаемости гематоэнцефалического барьера при БП, периферийно активированные Т-клетки и некоторые антитела могут частично проникать в мозговую ткань, хотя и менее эффективно, чем малые молекулы или нейтроактивные пептиды [10]. Поскольку при БП

страдают наиболее чувствительные к дофамину нейроны, конвенциональная терапия направлена на компенсацию недостатка дофамина за счёт предшественников данного нейромедиатора или регуляторов его метаболизма, таких как тирозингидроксилаза. Они обеспечивают лишь симптоматическое лечение, тогда как разрабатываемые препараты нового поколения, нацеленные на α Syn, должны ингибировать дегенерацию дофаминергических нейронов.

Направления дизайна препаратов нового поколения включают разработку экзогенных ингибиторов агрегации α Syn и активацию экспрессии эндогенных ингибиторов — шаперонов, таких как белки теплового шока [11, 12]. Наряду с активацией экспрессии обсуждается введение рекомбинантных белков теплового шока [12]. Среди экзогенных ингибиторов преобладают низкомолекулярные соединения и пептиды [13–15]. Некоторые ингибиторы пептидной природы были кратко охарактеризованы в обзорах 2020–2023 гг. [16, 17]. В них отсутствует соотнесение активности пептидов с результатами недавних исследований конформационного полиморфизма фибрилл α Syn. В настоящий обзор включены разработки последних лет, собрана актуальная информация о стратегиях дизайна пептидных ингибиторов агрегации α Syn, приведён сравнительный анализ лидеров и обсуждаются перспективы использования лидеров в качестве активных субстанций прототипов препаратов от БП.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СИНУКЛЕИНОВ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА И ЕГО СВЯЗЬ С ПАТОЛОГИЕЙ

Синуклеины — семейство небольших водорастворимых белков, экспрессируемых преимущественно в нервной ткани позвоночных [18]. Наиболее известным представителем семейства является α Syn — регулятор динамики синаптических везикул и высвобождения нейромедиаторов [19]. В мозговой ткани он в норме присутствует в виде мономера или тетрамера — вероятно, альфа-спирального [20]. Амфипатический N-концевой участок (NTR, N-terminal region) и центральный гидрофобный участок обеспечивают связывание α Syn с липидами мембраны и синаптических везикул [21]. Гидрофобный участок также ответственен за агрегацию [22]. Лишённый этого участка бета-синуклеин (β Syn), обнаруживаемый исключительно в мозговой ткани, не склонен к агрегации и проявляет холдазную активность в отношении α Syn, т. е. служит его шапероном, а также модулирует его взаимодействие с синаптическими везикулами [23]. Ту же регуляторную роль играет гамма-синуклеин (γ Syn), обнаруживаемый в периферической нервной системе, спинном мозге и некоторых видах опухолей [18]. Помимо контроля синаптической передачи ему приписывают участие в стабилизации микротрубочек [24] и контроле проонкогенных сигнальных путей [25].

В целом функции синуклеинов изучены слабо. Сравнительно полно охарактеризована лишь биологическая роль α Syn [22]. Именно его мутации, повышение экспрессии или нарушения посттрансляционных модификаций ассоциированы с развитием нейродегенеративных заболеваний, объединённых в категорию синуклеинопатий [26]. Патогенез синуклеинопатий, как и иных протеинопатий, имеет две составляющие. Первая связана с утратой функциональной активности белка, вторая — с появлением патологической активности. Однозначно соотнести их с риском патологии не всегда удаётся, поскольку синуклеинопатии являются многофакторными заболеваниями [27].

Функции α Syn, потеря которых объясняет часть симптомов БП, включают поддержание гомеостаза дофамина и контроль его высвобождения в синаптическую щель через Ca^{2+} -зависимые каналы либо при участии дофаминовых транспортеров [28]. Основной вклад α Syn в передачу нервного импульса сводится к обеспечению кластеризации синаптических везикул, которая предшествует высвобождению нейромедиаторов [29]. Кластеризация и слияние везикул с мембраной происходят за счёт комплекса N-этиленмалеимид-чувствительных белков прикрепления (SNARE), а α Syn выступает шапероном компонентов SNARE и катализирует сборку комплекса [30]. Патологической является прионоподобная активность α Syn, т. е. его способность агрегировать, формировать затравки для агрегации иных белков и распространяться в организме, преодолевая гематоэнцефалический барьер [31].

Патологические белковые образования, основным компонентом которых являются агрегаты α Syn, — тельца Леви — присутствуют в нейронах всех пациентов с синуклеинопатиями [32]. Их цитотоксическое действие проявляется в нарушении целостности мембраны, внутриклеточного транспорта и др. [33]. Часть агрегатов α Syn аморфны, прочие — амилоидные фибриллы и протофибриллы — имеют регулярную структуру кросс-бета-типа [34]; процесс их формирования

известен как амилоидизация [35]. Ядро таких структур составляют слоистые участки, образуемые параллельными или антипараллельными бета-тяжами одной полипептидной цепи; они расположены перпендикулярно общей оси и формируют стекинг-контакты [36].

Ввиду небольшого размера (140 аминокислотных остатков; 14,6 кДа) α Syn способен существовать в растворе достаточно продолжительное время в конформационно неупорядоченной форме [37], в растворах протяжённых неупорядоченных белков с гидрофобными участками ожидалось бы разделение фаз [38]. Взаимодействие с липидами цитоплазматической мембраны или везикул способствует частичному переходу α Syn в α -спиральную конформацию [39]. Как показали исследования в модельной системе с липидными нанодисками [40], первоначально контакты с липидами осуществляются за счёт электростатических взаимодействий липидной полярной головки с остатками лизина и глутаминовой кислоты искажённых повторов KTKEGV в NTR (аминокислотные остатки 1–60), что способствует спирализации этого участка (рис. 1, *a*). Далее центральный гидрофобный участок α Syn (аминокислотные остатки 61–95) контактирует с жирнокислотными остатками липидов.

Прочность контактов зависит от особенностей липидов, включая степень насыщенности жирнокислотных фрагментов, поэтому гидрофобный участок предлагается рассматривать в качестве сенсора на липиды [21]. Взаимодействие с жирнокислотными остатками стабилизирует комплексы, и альфа-спиральная конформация распространяется на гидрофобный участок [41]. С-концевой фрагмент α Syn (CTR, C-terminal region) остаётся в значительной степени неупорядоченным, что обеспечивает конформационную пластичность. Стоит отметить, что контакты с мембраной возможны не только для мономера α Syn, но и для тетрамера; более того, включение в липидные рафты может способствовать дальнейшей олигомеризации α Syn. Однако при сохранении альфа-спиральной конформации олигомеризация не приводит к амилоидизации, т. е. является непатологической [42].

АГРЕГАЦИЯ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА: ВЕРОЯТНЫЙ МЕХАНИЗМ, КЛЮЧЕВЫЕ МОТИВЫ И ПАТОГЕННЫЕ МУТАЦИИ

Амилоидизация, как и непатологическая олигомеризация, может происходить на поверхности липидного бислоя. Вероятно, риск амилоидизации отчасти определяется составом мембраны, хотя литературные данные на этот счёт противоречивы [43]. Ключевую роль в амилоидизации играет фрагмент гидрофобного участка α Syn (остатки 68–78), получивший название “NACore” (см. рис. 1, *a*); обозначение подчёркивает расположение в ядре итоговой фибриллы. Обозначение “NAC” (Non-A β component) принято для всего гидрофобного участка (остатки 61–95) и подчёркивает отличие его последовательности от элементов классических амилоидных фибрилл — A β -пептидов, хотя и является, по мнению ряда авторов, терминологической неточностью [44].

Согласно подкреплённой данными ЯМР-спектроскопии (ЯМР — ядерный магнитный резонанс) модели агрегации α Syn на поверхности липидного бислоя [45], триггером спонтанной амилоидизации может быть контакт ближайшего к NAC фрагмента NTR (остатки 57–61) и частично перекрывающегося с NACore фрагмента (остатки 73–80), что приводит к образованию бета-петли; в результате NACore сближается с серединой NTR (остатки 38–42) и также переводит её из альфа-спирали в бета-тяж. Это инициирует дальнейшие конформационные перестройки, а именно формирование множественных антипараллельных бета-тяжей в области остатков 38–95, которые определяют поперечное сечение протофибриллы. Последним включается ближайший к участку CTR фрагмент NAC (остатки 80–95).

Непосредственно в амилоидизации CTR (остатки 96–140) не участвует, напротив, его внутримолекулярные контакты с NTR и NAC препятствуют этому процессу [46], что подтверждается ускоренной агрегацией α Syn с делецией CTR [47]. В то же время CTR способен координировать катионы металлов, взаимодействие с которыми ускоряет агрегацию [48], и в нём сосредоточены основные посттрансляционные модификации α Syn, включая характерное для агрегатов в составе телец Леви фосфорилирование по остаткам Y125, S129, Y133, Y135 [49]. Роль гидрофобного участка (NAC) в амилоидизации подтверждается исследованиями продуктов делеции этого фрагмента: полученный белок структурно схож с β Syn, его способность к амилоидизации и нейротоксичность значительно снижены в сравнении с диким типом [47]. NACore и частично перекрывающийся с ним центральный фрагмент NAC (остатки 77–82), по-видимому, могут выступать затравками амилоидизации: показано, что их присутствие ускоряет кинетику агрегации. [50].

Определяющая роль аффинного к липидам NTR в конформационной динамике α Syn следует из анализа эффектов мутаций. Именно в NTR сосредоточены точечные мутации, ассоциированные с ранним развитием или быстрым прогрессированием БП: A18T, A29S, A30G/P [51], E46K [52], G46K, H50Q [53], G51D/E [54], A53T/V/E A53T [55], A53E [56] и A53V [57]. Существенное ускорение амилоидизации отмечается при мутациях в прилегающем к NAC фрагменте NTR: E46K, H50Q, A53T/V [58]. Участок их скопления (остатки 46–56) получил название “preNAC”.

Исследования последних лет указывают на полиморфизм фибрилл синуклеина [59, 60]. Доминирующие конформации зависят от микроокружения. Так, охарактеризованные методом криоэлектронной микроскопии структуры фибрилл, полученные в присутствии липидов [60], отличны от основанных на ЯМР-данных моделей фибрилл, ассоциированных с жирными кислотами [49], и более ранних моделей изолированных фибрилл, также охарактеризованных методом криоэлектронной микроскопии [61]. Конформации фибрилл могут меняться при наличии ассоциированных с БП мутаций, что было показано на примере фибрилл α Syn с мутацией E46K [62]. Характерные кросс-бета-элементы обнаружены во всех случаях: зрелые фибриллы составлены из симметрично расположенных протофибрилл, антипараллельные бета-слои в протофибриллах ориентированы перпендикулярно оси.

Различия касаются фрагментов, формирующих бета-тяжи, и их взаимного расположения (рис. 1, b). В свободных фибриллах, полученных *in vitro* без липидов, область preNAC с горячей точкой мутаций соответствует относительно протяжённой интерфазе протофибрилл [61]. Наблюдаемые в присутствии липидов фибриллы имеют две интерфазы между протофибриллами, не совпадающие с preNAC, а зазор между ними занимают фосфолипиды. Фибриллы, обнаруженные в тельцах Леви, выделенных из постмортальных образцов мозговой ткани, имеют на интерфазе между протофибриллами участок NAC, приближенный к CTR (остатки 85–95) [63], что согласуется моделью на основе ЯМР-данных [49].

Даже с учётом полиморфизма фибрилл все структурные данные подтверждают целесообразность нацеливания на фрагменты NAC и preNAC при дизайне терапевтических агентов для разрушения структур фибрилл или ингибирования их роста. Шаперонная функция β Syn изначально указывала на вероятность такого ингибирования гомологами α Syn, предположительно за счёт конкуренции между внутримолекулярными и межмолекулярными взаимодействиями. Это послужило предпосылкой к разработке и тестированию пептидных ингибиторов амилоидизации, стратегии дизайна которых рассмотрены ниже.

СТРАТЕГИИ РАЦИОНАЛЬНОГО ДИЗАЙНА ПЕПТИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ АГРЕГАЦИИ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА

Анализ литературы позволил выделить четыре основные стратегии рационального дизайна пептидных ингибиторов амилоидизации α Syn (рис. 2–4). Пятая объединяет два типа исследований, которые не могут считаться рациональным дизайном в классическом смысле, но представляются перспективной альтернативой ему благодаря быстрому прогрессу в области высокопроизводительного скрининга *in silico* и *in vitro*. Общий перечень стратегий представлен ниже:

- (1) отбор и оптимизация фрагментов самого α Syn;
- (2) отбор и оптимизация фрагментов гомологов α Syn;
- (3) отбор и оптимизация фрагментов белков-партнёров α Syn;
- (4) дизайн на основе искусственных каркасов;
- (5) дизайн *de novo* и селекция из библиотек случайных последовательностей.

Стратегия (1) опирается на данные как *in vitro*, так и *in vivo*, подтверждающие влияние укороченных вариантов α Syn на амилоидизацию [64]. Такие варианты являются продуктами альтернативного сплайсинга соответствующего предшественника матричной РНК или ограниченного протеолиза полноразмерного белка. В мозговой ткани их доля составляет до 15%, а длина варьируется: присутствуют пептиды и полипептиды [65]. Ингибирование амилоидизации или смещение равновесия между конформерами в направлении менее стабильных структур отмечено для полипептидов с укороченным NTR [66]. Оно объясняется конкуренцией полипептидов с бета-тяжами молекулы полноразмерного α Syn за другие бета-тяжи той же молекулы. Иными словами, межмолекулярные контакты укороченного α Syn нарушают необходимые для амилоидизации

внутримолекулярные контакты полноразмерного α Syn. Активирующее действие других (поли)пептидов — например, лишённых конформационно неупорядоченного CTR — на амилоидизацию α Syn объясняется тем, что они имеют большую скорость нуклеации (сборки затравок фибрилл) и их фибриллы способны выступать затравками для фибрилл полноразмерного α Syn [67].

Как было отмечено в предыдущем разделе, характерные для фибрилл внутримолекулярные контакты затрагивают NTR и NAC α Syn [59, 60, 63]. Фрагменты этих участков являются очевидными кандидатами в конкурентные ингибиторы амилоидизации и широко применяются в рациональном дизайне пептидных ингибиторов, соответствующем стратегии (1). В идеале итоговые пептидные ингибиторы должны иметь хорошую растворимость в водной среде и не должны формировать контактов с α Syn вне целевого бета-тяжа, что обеспечивается на этапе оптимизации за счёт модификаций: например, метилирования пептида по остаткам лизина или введения по концам остатков аминокислотной кислоты. Первый вариант использовался применительно к фрагменту NAC [68], второй — к фрагментам NTR и NAC [69]. Помимо ингибиторов агрегации α Syn модификации такого типа с успехом применялись ранее к ингибиторам агрегации бета-амилоидных пептидов [70]. Для повышения растворимости фрагментов NAC использовали добавление по концам остатков R или RG. Отдельно стоит отметить модификации, рассчитанные на аддитивное или синергетическое действие, а именно конъюгацию потенциальных пептидных ингибиторов с универсальным или неспецифическим блокатором фазовых переходов. Этот подход был опробован на примере фрагментов NTR [71]. В качестве неспецифических блокаторов рассматривали полифенолы растительного происхождения — эпигаллокатехин-3-галлат [72] и пирролохинолинхинон [73]. И полифенолы, и их конъюгаты с фрагментами NAC предотвращали амилоидизацию α Syn в модельной системе, которая, однако, не учитывает вклада липидов. Полифенолы оказывают протекторное (антиоксидантное) действие на липиды, но также предотвращают контакты с α Syn [74, 75], что в ряде случаев ускоряет амилоидизацию [76].

Промежуточным вариантом между стратегиями (1) и (2) является введение в синтетические фрагменты NTR или NAC мутаций, которые снижают риск амилоидизации полноразмерного α Syn [77]. Такие мутации выявлены в ходе анализа влияния единичных аминокислотных замен на кинетику агрегации α Syn *in vitro* [78]. Установлено, что замена гидрофобных аминокислотных остатков в NAC на заряженные, а также введение положительно заряженных остатков в NTR ингибируют и нуклеацию, и элонгацию фибрилл. Выраженное ингибирующее действие оказывали замены остатков NAC и примыкающего к нему фрагмента NTR на пролин, что согласуется с данными для других амилоидных фибрилл [79], а лидерами по ингибирующему действию оказались мутации в NACore (V66S/P, T72P, V74E/G, T75P). Примечательно, что мутанты не только сами демонстрировали минимальную скорость амилоидизации, но также снижали таковую для α Syn дикого типа — вероятно, из-за интерференции с образованием затравок фибрилл [78]. Итоговые ингибиторы амилоидизации на основе мутантного NACore представляли собой его синтетические фрагменты длиной 6–12 остатков.

Классическим примером стратегии (2) можно считать отбор фрагментов β Syn — ключевого гомолога и эндогенного шаперона α Syn [80]. Отбор проводился по данным скрининга сайтов связывания с использованием пептидных чипов [81]. В итоге за основу был взят фрагмент β Syn, аффинный к α Syn и имеющий высокую степень гомологии с фрагментом NTR, известным как P1-сайт (остатки 36–42). Этот сайт определяет первичные контакты α Syn с липидами по данным спектроскопии ЯМР. Дальнейшая оптимизация включала двойную модификацию пептидного остова, а именно замену L-аминокислотных остатков на D-аналоги и обращение последовательности (продукты такой модификации известны как ретроинвертированные пептиды) [82].

Классическим примером стратегии (3) является дизайн пептидных ингибиторов на основе малого убиквитин-подобного модификатора SUMO1 [83]. Наряду с другими посттрансляционными модификациями ковалентное присоединение остатков SUMO по остаткам лизина (сумоилирование) обеспечивает регуляцию активности α Syn и контроль его локализации [84]. В то же время возможны нековалентные взаимодействия SUMO с α Syn, затрагивающие сайты P1, preNAC и NACore [83]. Контакты α Syn–SUMO1 при этом могут конкурировать с внутримолекулярными контактами α Syn– α Syn, необходимыми для амилоидизации. Действительно, тестирование фрагментов SUMO1 выявило эффективные ингибиторы амилоидизации α Syn. Их потенциальные ограничения связаны с кросс-реактивностью (сайты узнавания SUMO присутствуют в широком спектре белков [85]), что является типичной проблемой стратегии (3).

Ещё одно характерное ограничение стратегии (3) — опора на интерактомные данные, часто неполные. Преодолеть его позволяет оригинальная комбинация со стратегией (2), обозначенная в литературе как «биомиметический подход». В отсутствие априорных знаний о белках-партнёрах, аффинных к мишеням (P1/preNAC/NACore), возможен поиск гомологов бета-тяжей мишеней по базам данных полноатомных моделей, таким как Protein Data Bank (PDB) или ProDa [86], и отбор контактирующих с ними тяжей. В случае внутримолекулярных структур контактирует обычно соседний бета-тяж, в комплексах он может относиться к иной молекуле. Данный подход успешно применялся для подбора пептидов, связывающих preNAC и NACore [86].

Термин «биомиметический подход» также применялся для обозначения оптимизации ингибиторов на основе фрагмента α Syn (остатки 60–70), который частично перекрывается с NACore, с целью повышения их растворимости за счёт введения точечных замен гидрофобных остатков на заряженные. Предполагалось, что мутантные гексамеры сохранят аффинность к бета-тяжу α Syn и выступают конкурентными ингибиторами внутримолекулярных взаимодействий [87]. Этот пример можно расценивать как комбинацию стратегий (1) и (2). В теории такая комбинированная стратегия допускает множественные мутации α Syn, но при этом вероятность сохранения аффинности снижается, а число тестируемых вариантов возрастает, и возникает потребность использования скрининговых методов. В известных примерах [88, 89] скрининг продуктов множественных мутаций фрагмента preNAC на сохранение аффинности к нативному α Syn осуществлялся методом анализа комплементации белковых фрагментов [90]. Изначально отбирали пептиды, аффинные к α Syn дикого типа [88], затем — к вариантам α Syn с повышающими риск развития БП мутациями в preNAC [89].

Стратегия (4) стоит несколько особняком, поскольку она не предполагает использования в качестве основы ни самого α Syn/гомологов, ни белков-партнёров. За основу ингибитора может быть взят искусственный каркас подходящей геометрии, сходной с кросс-бета-сечением или альфа-спиралью. Критерию кросс-бета-подобия соответствуют циклические пептиды с чередованием L- и D-аминокислотных остатков, которые образуют амилоидоподобные стопки (нанотрубки) при олигомеризации [91]. Для них ожидается слабое сродство к торцевым участкам любых фибрилл и способность ингибировать рост фибрилл. Боковые группы циклического пептидного каркаса могут обеспечить повышенную аффинность к мишени и активность. В случае α Syn эффективным ингибитором амилоидизации оказался циклический пептид, содержащий остатки ароматических аминокислот и лизина, который по данным ЯМР-спектроскопии контактирует с остатками 71–92 NAC и одним из искажённых повторов в NTR [92]. Другой вариант искусственного каркаса — миметики альфа-спиральных пептидов [93]. От их производных ожидается стабилизация мишени в непатогенной альфа-спиральной конформации за счёт спираль–спиральных взаимодействий. В случае α Syn речь идёт о спирализации имперфектных гексапептидных повторов KTKQGV [94]. Данная стратегия была реализована в отношении варианта таких повторов KTKQGV (остатки 20–25) из середины NTR; в качестве каркаса был предложен трибензамидный альфа-пептидомиметик; заместители в бензольных циклах, имитирующие боковые группы аминокислотных остатков, были подобраны для обеспечения контактов с KTKQGV [95].

Стратегии последнего типа (5) объединяет отсутствие гипотезы или априорных данных о ключевых контактах. Дизайн пептидов *de novo* опирается на современные инструменты молекулярного моделирования, такие как FastDesign программного пакета Rosetta [96], который предполагает итеративную оптимизацию последовательности и геометрии комплексов. В случае α Syn этот подход выявил NACore-связывающую последовательность с концевыми хаотропами — R/K-богатыми фрагментами, которые нарушают регулярную структуру фибрилл [97]. Селекция из частично или полностью рандомизированных библиотек проводится с использованием высокопроизводительных методов на основе пептидных/белковых чипов [98], фагового дисплея [99–101] или путём скрининга в дрожжах с использованием двугибридной системы [102]. Отдельно стоит упомянуть высокопроизводительный анализ интерактома с использованием метода комплементации фрагментов: он позволил выявить пептид, блокирующий агрегацию и значимые для патогенеза БП [103] взаимодействия α Syn с белком-партнёром из эндосомального комплекса сортировки ESCRT [104]. Примечательно, что метод на основе белковых чипов выявил ингибиторы амилоидизации среди производных известного проникающего пептида пенетратина [98]. Такие пептиды не требуют дополнительных векторов для внутриклеточной доставки, что упрощает дальнейшую разработку терапевтических агентов на их основе.

В общем случае пептидные ингибиторы агрегации α Syn не являются проникающими; их дальнейшая разработка может включать введение дополнительных шаттл-последовательностей, в том числе для

преодоления гематоэнцефалического барьера. Примером итогового пептида, функционального *in vivo*, является химера ингибирующей агрегацию фрагмента β Syn [105] с проникающим пептидом на основе вирусного транс-активатора транскрипции (Tat) и последовательностью degron, которая узнаётся убиквитин-лигазой, маркирующей химеру и α Syn для протеасомной деградации. Введение модуля degron позволяет параллельно с ингибированием агрегации активировать протеолиз избыточного или мутантного α Syn, что в теории позволяет полностью восстановить протеостаз. Помимо проблемы адресной доставки пептидных ингибиторов на этапе дизайна необходимо решить проблему их биостабильности. Часто она решается параллельно с оптимизацией сродства и специфичности к мишени. Например, упомянутые ретроинвертированные пептиды [69, 81, 106] не только устойчивы к ферментативному гидролизу в биологических средах благодаря неприродному остову, но нередко проявляют большее сродство к мишени, чем пептиды дикого типа.

ПРИМЕРЫ ПЕПТИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ АГРЕГАЦИИ И МЕТОДЫ ИХ ТЕСТИРОВАНИЯ

Полный цикл тестирования ингибиторов агрегации α Syn включает проверку активности на рекомбинантном белке, в клетках и в животных моделях. Примеры пептидов, прошедших полный цикл, единичны. Активность в животных моделях с подтверждением механизма на первичных нейронах показана лишь для двух пептидов. Один из них — Tat- β S-degron, химера разработанного в рамках стратегии (2) фрагмента β Syn с проникающим пептидом и мотивом degron [105]. Другой — пептид PDper1.3, ингибитор контактов α Syn-ESCRT, отобранный из библиотек случайных последовательностей в рамках стратегии (5) с использованием метода комплементации слитых с α Syn фрагментов флуоресцентного белка для детекции агрегации по восстановлению флуоресценции [104]. Оба пептида примечательны тем, что способствуют элиминации избыточного или мутантного α Syn и его агрегатов, хотя механизмы различны. Пептид Tat- β S-degron обеспечивает маркирование α Syn для протеасомной деградации за счёт привлечения убиквитин-лигазы, тогда как PDper1.3 восстанавливает эндолизосомальный сигнальный путь и лизосомную деградацию агрегатов, нарушение которой обусловлено взаимодействием α Syn и ESCRT. Влияние пептидов Tat- β S-degron и PDper1.3 на агрегацию и общее содержание α Syn подтверждено методами иммуноцитохимического окрашивания и иммуноблотинга на культуре первичных нейронов, выделенных из эмбрионов крыс [104, 105] или на дифференцированных в дофаминергические нейроны индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, полученных от пациентов с БП [104]. При этом для контроля общего уровня экспрессии α Syn были использованы стандартные антитела, а олигомеры и фибриллы детектировали с помощью специфичного к конформации антитела Syn-O2 [107].

Ингибиторная активность PDper1.3 в нейронах была также подтверждена в модели амилоидизации, индуцированной добавлением экзогенных фибрилл (предварительно реконструированных из рекомбинантного белка) без дополнительных векторов [108]. Предполагается, что фибриллы проникают в клетки по механизму клатрин-зависимого эндоцитоза, хотя не исключены альтернативные варианты — от прямого транспорта до макропиноцитоза [109]. После интернализации в экзогенные фибриллы включается эндогенный α Syn, амилоидизация сопровождается гиперфосфорилированием его CTR и образованием включений, подобных тельцам Леви, которые могут быть идентифицированы в ходе обычного морфологического исследования либо методами иммуноцитохимии с антителами к фосфорилированной форме α Syn. Индуцированная амилоидизация требует значительной концентрации эндогенного α Syn, поэтому её часто сочетают с предварительной трансфекцией или трансдукцией векторами, несущими ген α Syn. При тестировании PDper1.3 клетки предварительно трансдуцировали аденоассоциированным вектором (adeno-associated dependoparvovirus A, AAV) с геном мутанта α Syn A53T; для доставки PDper1.3 также использовали AAV [104]. Пептид Tat- β S-degron проникал в первичные нейроны самопроизвольно [105], хотя интернализация требовала высоких концентраций (25 мкМ) и продолжительной инкубации (48 ч).

Для тестирования PDper1.3 в животной модели (крысы) гены α Syn дикого типа или A53T, как и PDper1.3, доставляли в мозговую ткань в составе AAV путём инъекции непосредственно в чёрную субстанцию [104]. В случае Tat- β S-degron использовали модель M83 — трансгенные мыши с экспрессией мутанта α Syn A53T в мозговой ткани за счёт тканеспецифичного промотора. Для данной модели характерно медленное прогрессирование, и с целью ускорения тестирования препаратов допускается дополнительное интрацеребральное введение экзогенных фибрилл [110]. Препарат Tat- β S-degron вводился через 3 дня после инъекции фибрилл внутривентриально в течение

20 дней в дозировке 40 мг/кг [105]; в случае PDper1.3 введение в составе AAV было однократным [104]. Анализ эффектов обоих пептидов в животных моделях основывался на данных поведенческих тестов, а также на данных морфометрии и иммуногистохимического окрашивания срезов мозга. В обоих случаях подтвердилось нейропротекторное действие: пептиды снижали агрегацию α Syn, восстанавливали выживаемость нейронов и снижали выраженность нарушений моторных функций. Хотя трансгенные грызуны — ключевые животные модели БП, используемые в доклинических исследованиях, для предварительного тестирования пригодны более простые варианты. Например, PDper1.3 [104] изначально тестировали в трансгенных нематодах с экспрессией α Syn, несущего мутацию A30P [111]. У нематод повреждение дофаминергических нейронов проявляется как укорочение нейритов в области задних дейридов (органов чувств), а ингибирование амилоидизации — как восстановление их морфологии. Удобной моделью признаны также трансгенные мухи *Drosophila melanogaster* [112]. При использовании вектора с тканеспецифичным промотором для экспрессии α Syn в сетчатке характерным проявлением патологической агрегации является макулодистрофия, при экспрессии во всех нейронах нарушаются преимущественно моторные функции. Проявления обоих типов, а также ожидаемое восстановление функции под действием пептидного ингибитора агрегации α Syn детектируются в поведенческих тестах. Трансгенных *D. melanogaster* применяли в тестировании пептида — фрагмента β Syn [81], разработанного в рамках стратегии (2), а также пептида — фрагмента SUMO1 [83], разработанного в рамках стратегии (3). Первый вызывал выраженное (более 80%) восстановление моторных функций насекомых при добавлении в пищу до концентрации около 700 мкМ [81], второй показал сходные эффекты в диапазоне концентраций 120–240 мкМ [83].

Тестирование пептидных ингибиторов агрегации α Syn в клеточных моделях часто проводится не на первичных нейронах, а на иммортализованных нейроноподобных клетках, что в общем случае обеспечивает более высокую воспроизводимость результатов. Популярные нейроноподобные модели БП включают линии нейроглиомы (например, H4) или нейробластомы (SH-SY5Y) со сверхэкспрессией α Syn, обработкой экзогенными фибриллами и др. Модель на основе линии H4 применялась для тестирования пептидов T02/3/5/6 [113] — продуктов *in silico* мутагенеза ингибиторов амилоидизации K84s и K102s [102], отобранных ранее скрининговым методом на основе двугибридной системы в рамках стратегии (5). Особенностью модели на основе H4 [113] является учёт вклада дополнительного (минорного в сравнении с α Syn) компонента телец Леви — синфилина-1 (α SynIP — белок, взаимодействующий с α Syn) в агрегацию α Syn [114]. Образование агрегатов наблюдалось после сотрансфекции H4 конструкциями с α Syn дикого типа и α SynIP. Ингибирующее действие пептидов T02/3/5/6 на агрегацию отслеживалось по данным иммуноцитохимии и проявлялось при концентрации 10 мкМ. Примечательно, что пептиды проникали в клетки без дополнительного вектора, хотя и не являются производными известных проникающих пептидов.

При тестировании SUMO1 [83] использовали модель на основе линии SH-SY5Y со сверхэкспрессией α Syn, слитого с фрагментами флуоресцентного белка. Комплементация фрагментов сопровождалась разгоранием флуоресценции и свидетельствовала об агрегации химерного белка. В присутствии пептида SUMO1 доля агрегатов значительно снижалась, а выживаемость SH-SY5Y возрастала. Аналогично T02/3/5/6 пептид SUMO1 проникал в клетки самопроизвольно, что было подтверждено данными флуоресцентной микроскопии для его меченого производного [83].

Упрощённая (без сверхэкспрессии α Syn) модель на основе SH-SY5Y применялась для тестирования гексапептида KEQPTN, полученного путём оптимизации фрагмента NAC введением точечных мутаций в рамках комбинированной стратегии (1)–(2) [87], а также пептидов, отобранных с использованием белковых чипов в рамках стратегии (5) [98], среди которых выделялось производное пенетратина p216. В упрощённой модели оценивали выживаемость клеток нейробластомы, обработанных экзогенными фибриллами в концентрациях от 0,14 мкг/мл [98] до 3 мг/мл [87]. В отсутствие ингибиторов агрегации это снижало выживаемость клеток на 30–50%. Добавление гексапептида KEQPTN к препарату экзогенных фибрилл практически полностью восстанавливало выживаемость клеток при концентрации пептида около 70 мкМ. Производное пенетратина p216 в концентрации около 20 мкМ восстанавливало выживаемость клеток на 20%. В первом приближении гексапептид видится более активным. Однако, несмотря на однотипные модели, прямое сравнение невозможно ввиду использования различных соотношений «ингибитор/фибриллы».

Вместо нейроноподобных могут быть использованы иные иммортализованные клеточные линии, экспрессирующие α Syn. Например, при тестировании продуктов *de novo* дизайна аффинных к NACore пептидов в рамках стратегии (5) [97] применяли аналогичную описанной выше для SH-

SY5Y модель на основе НЕК 293 [115]. Стабильно экспрессирующие гибриды α Syn с флуоресцентным белком клетки НЕК 293 были обработаны экзогенными фибриллами (125 нМ в пересчёте на мономер α Syn) в смеси с тестируемыми пептидами (25–100 моль-экв. по отношению к α Syn). Эффекты пептидов оценивали по снижению среднего числа интенсивно окрашенных цитоплазматических включений. В качестве дополнительного контроля вместо фибрилл, реконструированных из рекомбинантного α Syn, использовали экстракты мозговой ткани, полученной от пациентов с множественной системной атрофией. Пептиды-лидеры дозозависимо снижали агрегацию α Syn в данной модели; эффект достигал 80% при концентрации пептидов в низком микромолярном диапазоне.

Менее информативной представляется оценка влияния пептидов на токсичность экзогенных фибрилл в отношении клеток с минимальным уровнем экспрессии α Syn, таких как клетки линий аденокарциномы Caco-2 и остеосаркомы U2-OS. Внутриклеточное ингибирование агрегации в этом случае остаётся под вопросом, в отличие от аналогичных экспериментов на нейроноподобных клетках со значимым базальным уровнем эндогенного α Syn [87, 98]. Упрощённая проверка активности в Caco-2 и U2-OS применялась для разработанных в рамках стратегии (1) производных фрагментов NTR и NAC — природных/ретроинвертированных пептидов NTR/NAC-TP-L/D и NAC-TP-L/D [69] и конъюгатов с пирролохинолинхиномом PQQ- α Syn36-46 [71], соответственно. Экзогенные фибриллы в концентрации 10–100 мкМ в пересчёте на мономер α Syn снижали выживаемость клеток на 40–60%. Предварительная инкубация с 2 экв. PQQ- α Syn36-46 [71] снижала цитотоксичность фибрилл вдвое, однако эффект значимо не отличался от эффекта изолированного пирролохинолинхинона. Аналогичный эффект достигался для 1 экв. ретроинвертированного пептида NTR-TP-D, а пятикратный избыток практически полностью восстанавливал выживаемость клеток [69]. Аналоги с природным остовом и конъюгаты — производные NAC — показали меньшую активность.

Среди клеточных линий грызунов валидированной для проверки токсичности фибрилл является линия клеток феохромоцитомы крыс PC12 [116]. Она использовалась при оценке эффектов пептидов — продуктов множественных мутаций PreNAC в рамках «биомиметического подхода» — гибридной стратегии (1)–(2) [88]. Выраженная токсичность проявлялась при концентрации фибрилл около 5 мкМ в пересчёте на мономер α Syn, а их предварительная инкубация с пептидом-лидером 54-54W восстанавливала выживаемость клеток более чем на 80% [88].

Золотым стандартом предварительного *in vitro* тестирования признан анализ влияния пептидов на кинетику агрегации рекомбинантного α Syn с флуориметрической детекцией в присутствии флуорогенного зонда на амилоиды — тиофлавина Т (ThT-тест) [117]. В ранних исследованиях авторы, как правило, ограничивались ThT-тестом без подтверждения активности на клеточных культурах. Среди знаковых работ такого рода стоит отметить получение метилированного производного фрагмента NAC в рамках стратегии (1) [68], дизайн фрагментов NTR и NAC с ингибирующими амилоидизацию мутациями [77] в рамках комбинированной стратегии (1)–(2), а также отбор аффинных к гомологам α Syn последовательностей по базам данных [73, 86] в рамках комбинированной стратегии (2)–(3). Прямое сравнение этих пептидов с вышеупомянутыми и друг с другом осложняется различием в протоколах ThT-теста (использовались разные концентрации α Syn и соотношения α Syn:пептид). Тем не менее соединения-лидеры показали в ThT-тестах активность, которая в первом приближении сопоставима с таковой для пептидов, чей эффект подтверждён на клеточных и животных моделях. Таким образом, нельзя исключать целесообразность дальнейшего тестирования и дальнейшей разработки представленных в ранних исследованиях пептидов-лидеров [77, 86].

Последовательности пептидов-лидеров в рамках каждой из упомянутых стратегий разработки, а также характеристика их активности в ThT-тестах, клеточных моделях или животных моделях представлены в приложении 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ известных пептидных ингибиторов агрегации α Syn позволил выделить пять основных стратегий их дизайна. Большинство предполагает использовать в качестве основы фрагменты самого α Syn, его гомологов или белков-партнёров. Из числа этих фрагментов и их производных отбираются пептиды, которые связывают и экранируют бета-тяжи N-концевого или центрального участка α Syn, предотвращая формирование внутримолекулярных контактов, характерных для кросс-бета-структур. Дальнейшая оптимизация пептидов включает точечный мутагенез, обращение

последовательности и конфигурации остова с получением ретроинвертированных аналогов или иные модификации. В последние годы также активно применяются комбинированные стратегии с элементами селекции и *de novo* дизайна *in silico*. Значительная часть пептидов, продуктов рационального дизайна и селекции, демонстрирует способность проникать через клеточную мембрану без дополнительных векторов, часть содержит фрагменты известных проникающих пептидов. Их ингибиторное действие на агрегацию α Syn, выявленное *in vitro*, подтверждается в клеточных моделях. Однако примеры пептидов с активностью, подтверждённой *in vivo*, единичны. Из двух пептидов, активность которых показана в трансгенных грызунах, один эффективно проникает в клетки-мишени за счёт шаттл-последовательности, другой требует доставки с помощью AAV. Данные тестов *in vivo* указывают на потенциальную применимость пептидных ингибиторов для предотвращения нарушения моторных функций и иных проявлений паркинсонизма, обусловленных агрегацией α Syn. Ряд пептидов, протестированных к настоящему времени исключительно *in vitro* или в упрощённых моделях паркинсонизма, также представляются перспективными, и их дальнейшая проверка целесообразна. Ключевой проблемой, практически не освещённой разработчиками пептидов, остаётся доставка пептидов, в том числе через гематоэнцефалический барьер. Однако способность преодолевать этот барьер не исключена для коротких пептидов, их ретроинвертированных аналогов или пептидов с шаттл-последовательностями. Решение данного вопроса может ускорить получение эффективных препаратов-нейропротекторов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. М.С. Юдин — определение концепции, работа с данными, написание черновика, пересмотр и редактирование рукописи; А.М. Варижук — написание черновика, визуализация, пересмотр и редактирование рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Благодарности. Неприменимо.

Этическая экспертиза. Неприменимо.

Согласие на публикацию. Неприменимо.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания № 124031200005-4 «Шаперон».

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При проведении исследования и создании настоящей статьи авторы не использовали ранее полученные и опубликованные сведения (данные, текст, иллюстрации).

Доступ к данным. Редакционная политика в отношении совместного использования данных к настоящей работе не применима, новые данные не собирали и не создавали.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали три внешних рецензента, один член редакционной коллегии и научный редактор издания.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: M.S. Iudin: conceptualization, data curation, writing—original draft, writing—review & editing; A.M. Varizhuk: writing—original draft, visualization, writing—review & editing. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Acknowledgments: Not applicable.

Ethics approval: Not applicable.

Consent for publication: Not applicable.

Funding sources: This study was part of State Assignment No. 124031200005-4 “Chaperon.”

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

Data availability statement: The editorial policy regarding data sharing does not apply to this work, as no new data was collected or created.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer-review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer-review process involved three external reviewers, a member of the Editorial Board, and the in-house science editor.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kinger S, Jagtap YA, Kumar P, et al. Proteostasis in neurodegenerative diseases. *Adv Clin Chem.* 2024;121:270–333. doi: 10.1016/bs.acc.2024.04.002
2. Bayer T. A. (2015). Proteinopathies, a core concept for understanding and ultimately treating degenerative disorders?. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 25(5), 713–724. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.03.007>. Pchelina SN Alpha-synuclein as a biomarker of Parkinson's disease. *Annals of Clinical and Experimental Neurology.* 2011;5(4):46–51. (In Russ.) EDN: OOKEMF
3. Blokhin VE, Ugryumov MV. Alpha-synuclein in the blood of mice in a neurotoxic model of Parkinson's disease. *Neurochemical Journal.* 2021;15(1):18–23. doi: 10.31857/s1027813321010027 EDN: AZDXKB
4. Taymans JM, Fell M, Greenamyre T, et al. Perspective on the current state of the LRRK2 field. *NPJ Parkinsons Dis.* 2023;9(1):104. doi:10.1038/s41531-023-00544-7
5. Alharbi B, Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, et al. Role of GABA pathway in motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease: a bidirectional circuit. *Eur J Med Res.* 2024;29(1):205. doi: 10.1186/s40001-024-01779-7 EDN: YBNZNK
6. Koga S, Sekiya H, Kondru N, et al. Neuropathology and molecular diagnosis of Synucleinopathies. *Mol Neurodegener.* 2021;16(1):83. doi: 10.1186/s13024-021-00501-z EDN: PKQVSU
7. Paredes-Rodriguez E, Vegas-Suarez S, Morera-Herreras T, et al. The noradrenergic system in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol.* 2020;11:435. doi: 10.3389/fphar.2020.00435 EDN: LBPLJY
8. Saravanan CR, Eisa RFH, Gaviria E, et al. The efficacy and safety of gene therapy approaches in Parkinson's disease: A systematic review. *Dis Mon.* 2024;70(7):101754. doi: 10.1016/j.disamonth.2024.101754 EDN: PUQDXD
9. Pagano G, Taylor KI, Anzures Cabrera J, et al. Prasinezumab slows motor progression in rapidly progressing early-stage Parkinson's disease. *Nat Med.* 2024;30(4):1096–1103. doi: 10.1038/s41591-024-02886-y EDN: PXUNTH
10. Wankhede NL, Kale MB, Upaganlawar AB, et al. Involvement of molecular chaperone in protein-misfolding brain diseases. *Biomed Pharmacother.* 2022;147:112647. doi: 10.1016/j.biopha.2022.112647 EDN: BKBZKX
11. Pazi MB, Belan DV, Komarova EY, Ekimova IV. Intranasal administration of GRP78 protein (HSPA5) confers neuroprotection in a lactacystin-induced rat model of parkinson's disease. *Int J Mol Sci.* 2024;25(7):3951. doi: 10.3390/ijms25073951 EDN: JLV CYE
12. Nwabufo CK, Aigbogun OP. Diagnostic and therapeutic agents that target alpha-synuclein in Parkinson's disease. *J Neurol.* 2022;269(11):5762–5786. doi: 10.1007/s00415-022-11267-9 EDN: CABBEA
13. Horne RI, Andrzejewska EA, Alam P, et al. Discovery of potent inhibitors of α -synuclein aggregation using structure-based iterative learning. *Nat Chem Biol.* 2024;20(5):634–645. doi: 10.1038/s41589-024-01580-x EDN: LOGQCI

14. Dada ST, Toprakcioglu Z, Cali MP, et al. Pharmacological inhibition of α -synuclein aggregation within liquid condensates. *Nat Commun.* 2024;15(1):3835. doi: 10.1038/s41467-024-47585-x EDN: FLTXIW
15. Mitra A, Sarkar N. Sequence and structure-based peptides as potent amyloid inhibitors: A review. *Arch Biochem Biophys.* 2020;695:108614. doi: 10.1016/j.abb.2020.108614 EDN: PXBYFO
16. Allen SG, Meade RM, White Stenner LL, Mason JM. Peptide-based approaches to directly target alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Mol Neurodegener.* 2023;18(1):80. doi: 10.1186/s13024-023-00675-8 EDN: IYFCVU
17. Surguchov A. Molecular and cellular biology of synucleins. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008;270:225–317. doi: 10.1016/S1937-6448(08)01406-8 EDN: MSLAWB
18. Cheng F, Vivacqua G, Yu S. The role of α -synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J Chem Neuroanat.* 2011;42(4):242–248. doi: 10.1016/j.jchemneu.2010.12.001
19. Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature.* 2011;477(7362):107–110. doi: 10.1038/nature10324
20. Fusco G, De Simone A, Gopinath T, et al. Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat Commun.* 2014;5:3827. doi: 10.1038/ncomms4827 EDN: UOFKQJ
21. Bisi N, Feni L, Peqini K, et al. α -Synuclein: an all-inclusive trip around its structure, influencing factors and applied techniques. *Front Chem.* 2021;9:666585. doi: 10.3389/fchem.2021.666585 EDN: JFSDIJ
22. Hayashi J, Carver JA. β -Synuclein: an enigmatic protein with diverse functionality. *Biomolecules.* 2022;12(1):142. doi: 10.3390/biom12010142 EDN: NAHQBX
23. Zhang H, Kouadio A, Cartledge D, Godwin AK. Role of gamma-synuclein in microtubule regulation. *Exp Cell Res.* 2011;317(10):1330–1339. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.10.013
24. Pan ZZ, Bruening W, Giasson BI, et al. Gamma-synuclein promotes cancer cell survival and inhibits stress- and chemotherapy drug-induced apoptosis by modulating MAPK pathways. *J Biol Chem.* 2002;277(38):35050–35060. doi: 10.1074/jbc.M201650200 EDN: LWUZPB
25. Calabresi P, Mechelli A, Natale G, et al. Alpha-synuclein in Parkinson's disease and other synucleinopathies: from overt neurodegeneration back to early synaptic dysfunction. *Cell Death Dis.* 2023;14(3):176. doi: 10.1038/s41419-023-05672-9 EDN: BRJGBC
26. Lázaro DF, Lee VM. Navigating through the complexities of synucleinopathies: Insights into pathogenesis, heterogeneity, and future perspectives. *Neuron.* 2024;112(18):3029–3042. doi: 10.1016/j.neuron.2024.05.017 EDN: ZZLWED
27. Butler B, Sambo D, Khoshbouei H. Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. *J Chem Neuroanat.* 2017;83-84:41–49. doi: 10.1016/j.jchemneu.2016.06.001 EDN: YEXKSO
28. Diao J, Burré J, Vivona S, et al. Native α -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle

- mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *Elife*. 2013;2:e00592. doi: 10.7554/eLife.00592 EDN: RJRYJX
29. Yoo G, Shin YK, Lee NK. The role of α -Synuclein in SNARE-mediated synaptic vesicle fusion. *J Mol Biol*. 2023;435(1):167775. doi: 10.1016/j.jmb.2022.167775 EDN: ARWDZE
 30. Volpicelli-Daley L, Brundin P. Prion-like propagation of pathology in Parkinson disease. *Handb Clin Neurol*. 2018;153:321–335. doi: 10.1016/B978-0-444-63945-5.00017-9
 31. Mahul-Mellier AL, Bartscher J, Maharjan N, et al. The process of Lewy body formation, rather than simply α -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(9):4971–4982. doi: 10.1073/pnas.1913904117 EDN: TGOUZH
 32. Power JH, Barnes OL, Chegini F. Lewy bodies and the mechanisms of neuronal cell death in parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain Pathol*. 2017;27(1):3–12. doi: 10.1111/bpa.12344
 33. Fink AL. The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein. *Acc Chem Res*. 2006;39(9):628–634. doi: 10.1021/ar050073t EDN: MKMRAN
 34. Alraawi Z, Banerjee N, Mohanty S, Kumar TKS. Amyloidogenesis: what do we know so far? *Int J Mol Sci*. 2022;23(22):13970. doi: 10.3390/ijms232213970 EDN: ZFHZSL
 35. Li D, Liu C. Structural diversity of amyloid fibrils and advances in their structure determination. *Biochemistry*. 2020;59(5):639–646. doi: 10.1021/acs.biochem.9b01069 EDN: REWCTA
 36. Theillet FX, Binolfi A, Bekei B, et al. Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature*. 2016;530(7588):45–50. doi: 10.1038/nature16531 EDN: WPJCWT
 37. Mukherjee S, Schäfer LV. Thermodynamic forces from protein and water govern condensate formation of an intrinsically disordered protein domain. *Nat Commun*. 2023;14(1):5892. doi: 10.1038/s41467-023-41586-y EDN: WOFHFW
 38. Zhu M, Fink AL. Lipid binding inhibits alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem*. 2003;278(19):16873–16877. doi: 10.1074/jbc.M210136200 EDN: MEOTWN
 39. Viennet T, Wördehoff MM, Uluca B, et al. Structural insights from lipid-bilayer nanodiscs link α -Synuclein membrane-binding modes to amyloid fibril formation. *Commun Biol*. 2018;1:44. doi: 10.1038/s42003-018-0049-z EDN: FMMJVE
 40. Sarchione A, Marchand A, Taymans JM, Chartier-Harlin MC. Alpha-synuclein and lipids: the elephant in the room? *Cells*. 2021;10(9):2452. doi: 10.3390/cells10092452 EDN: HCWNHX
 41. Burré, J., Sharma, M., & Südhof, T. C. (2015). Definition of a molecular pathway mediating α -synuclein neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(13), 5221–5232. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4650-14.2015>
 42. Alza NP, Iglesias González PA, Conde MA, et al. Lipids at the crossroad of α -synuclein function and dysfunction: biological and pathological implications. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:175. doi: 10.3389/fncel.2019.00175 EDN: UXMCPO

43. Goedert M, Griesinger C, Outeiro TF, et al. Abandon the NAC in α -synuclein. *Lancet Neurol.* 2024;23(7):669. doi: 10.1016/S1474-4422(24)00176-5 EDN: OOGAJZ
44. Antonschmidt L, Dervişoğlu R, Sant V, et al. Insights into the molecular mechanism of amyloid filament formation: Segmental folding of α -synuclein on lipid membranes. *Sci Adv.* 2021;7(20):eabg2174. doi: 10.1126/sciadv.abg2174 EDN: MEALGX
45. Hong DP, Xiong W, Chang JY, Jiang C. The role of the C-terminus of human α -synuclein: intra-disulfide bonds between the C-terminus and other regions stabilize non-fibrillar monomeric isomers. *FEBS Lett.* 2011;585(3):561–566. doi: 10.1016/j.febslet.2011.01.009 EDN: OLFNTH
46. Suthar SK, Lee SY. Truncation or proteolysis of α -synuclein in Parkinsonism. *Ageing Res Rev.* 2023;90:101978. doi: 10.1016/j.arr.2023.101978 EDN: GKFQIM
47. Binolfi A, Rasia RM, Bertocini CW, et al. Interaction of alpha-synuclein with divalent metal ions reveals key differences: a link between structure, binding specificity and fibrillation enhancement. *J Am Chem Soc.* 2006;128(30):9893–9901. doi: 10.1021/ja0618649 EDN: MIFZYP
48. Kleinknecht A, Popova B, Lázaro DF, et al. C-terminal tyrosine residue modifications modulate the protective phosphorylation of serine 129 of α -synuclein in a yeast model of Parkinson's disease. *PLoS Genet.* 2016;12(6):e1006098. doi: 10.1371/journal.pgen.1006098 EDN: WRJLAZ
49. Rodriguez JA, Ivanova MI, Sawaya MR, et al. Structure of the toxic core of α -synuclein from invisible crystals. *Nature.* 2015;525(7570):486–490. doi: 10.1038/nature15368
50. Krüger R, Kuhn W, Müller T, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 1998;18(2):106–108. doi: 10.1038/ng0298-106
51. Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 2004;55(2):164–173. doi: 10.1002/ana.10795
52. Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, et al. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2013;28(6):811–813. doi: 10.1002/mds.25421
53. Lesage S, Anheim M, Letournel F, et al. G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol.* 2013;73(4):459–471. doi: 10.1002/ana.23894
54. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 1997;276(5321):2045–2047. doi: 10.1126/science.276.5321.2045 EDN: EKFXYL
55. Pasanen P, Myllykangas L, Siitonen M, et al. Novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol Aging.* 2014;35(9):2180.e1–2180.e21805. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.024
56. Yoshino H, Hirano M, Stoessl AJ, et al. Homozygous alpha-synuclein p.A53V in familial Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2017;57:248.e7–248.e12. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.05.022

57. Mehra S, Gadhe L, Bera R, et al. Structural and functional insights into α -synuclein fibril polymorphism. *Biomolecules*. 2021;11(10):1419. doi: 10.3390/biom11101419 EDN: EWBDWV
58. Meade RM, Williams RJ, Mason JM. A series of helical α -synuclein fibril polymorphs are populated in the presence of lipid vesicles. *NPJ Parkinsons Dis*. 2020;6:17. doi: 10.1038/s41531-020-00122-1 EDN: ELPQAF
59. Frieg B, Antonschmidt L, Dienemann C, et al. The 3D structure of lipidic fibrils of α -synuclein. *Nat Commun*. 2022;13(1):6810. doi: 10.1038/s41467-022-34552-7 EDN: HFDWKQ
60. Guerrero-Ferreira R, Taylor NM, Mona D, et al. Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. *Elife*. 2018;7:e36402. doi: 10.7554/eLife.36402
61. Boyer DR, Li B, Sun C, et al. The α -synuclein hereditary mutation E46K unlocks a more stable, pathogenic fibril structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(7):3592–3602. doi: 10.1073/pnas.1917914117 EDN: DKGDUC
62. Dhavale DD, Barclay AM, Borcik CG, et al. Structure of alpha-synuclein fibrils derived from human Lewy body dementia tissue. *Nat Commun*. 2024;15(1):2750. doi: 10.1038/s41467-024-46832-5 EDN: WCSAZF
63. Mahul-Mellier AL, Altay MF, Maharjan N, et al. Differential role of C-terminal truncations on alpha-synuclein pathology and Lewy body formation. *NPJ Parkinsons Dis*. 2025;11(1):261. doi: 10.1038/s41531-025-01084-y EDN: BGUZUV
64. Muntané G, Ferrer I, Martinez-Vicente M. α -Synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. *Neuroscience*. 2012;200:106–119. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.042 EDN: PKYVIV
65. Terada M, Suzuki G, Nonaka T, et al. The effect of truncation on prion-like properties of α -synuclein. *J Biol Chem*. 2018;293(36):13910–13920. doi: 10.1074/jbc.RA118.001862 EDN: YKKFKX
66. Sorrentino ZA, Giasson BI. The emerging role of α -synuclein truncation in aggregation and disease. *J Biol Chem*. 2020;295(30):10224–10244. doi: 10.1074/jbc.REV120.011743 EDN: TJOEPZ
67. Madine J, Doig AJ, Middleton DA. Design of an N-methylated peptide inhibitor of alpha-synuclein aggregation guided by solid-state NMR. *J Am Chem Soc*. 2008;130(25):7873–7881. doi: 10.1021/ja075356q
68. Horsley JR, Jovcevski B, Pukala TL, Abell AD. Designer D-peptides targeting the N-terminal region of α -synuclein to prevent parkinsonian-associated fibrilization and cytotoxicity. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2022;1870(10):140826. doi: 10.1016/j.bbapap.2022.140826 EDN: HSIJXG
69. Gilead S, Gazit E. Inhibition of amyloid fibril formation by peptide analogues modified with alpha-aminoisobutyric acid. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2004;43(31):4041–4044. doi: 10.1002/anie.200353565
70. Yoshida W, Kobayashi N, Sasaki Y, et al. Partial peptide of α -synuclein modified with small-

- molecule inhibitors specifically inhibits amyloid fibrillation of α -synuclein. *Int J Mol Sci.* 2013;14(2):2590–2600. doi: 10.3390/ijms14022590
71. Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, et al. EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(17):7710–7715. doi: 10.1073/pnas.0910723107 EDN: MZIMHZ
72. Kobayashi, M., Kim, J., Kobayashi, N., Han, S., Nakamura, C., Ikebukuro, K., & Sode, K. (2006). Pyrroloquinoline quinone (PQQ) prevents fibril formation of alpha-synuclein. *Biochemical and biophysical research communications*, 349(3), 1139–1144. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.144>
73. Yang JE, Rhoo KY, Lee S, et al. EGCG-mediated protection of the membrane disruption and cytotoxicity caused by the 'active oligomer' of α -synuclein. *Sci Rep.* 2017;7(1):17945. doi: 10.1038/s41598-017-18349-z EDN: YDTXCP
74. Yang Z, Yao Y, Zhou Y, et al. EGCG attenuates α -synuclein protofibril-membrane interactions and disrupts the protofibril. *Int J Biol Macromol.* 2023;230:123194. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123194 EDN: UJZQLE
75. Grønnemose AL, Østerlund EC, Otzen DE, Jørgensen TJD. EGCG has dual and opposing effects on the n-terminal region of self-associating α -synuclein oligomers. *J Mol Biol.* 2022;434(23):167855. doi: 10.1016/j.jmb.2022.167855 EDN: MQSKXC
76. Kim YS, Lim D, Kim JY, et al. Beta-Sheet-breaking peptides inhibit the fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;387(4):682–687. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.083
77. Koo HJ, Lee HJ, Im H. Sequence determinants regulating fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368(3):772–778. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.01.140 EDN: MIGAEJ
78. Hasanbašić S, Taler-Verčič A, Puizdar V, et al. Prolines affect the nucleation phase of amyloid fibrillation reaction; mutational analysis of human stefin B. *ACS Chem Neurosci.* 2019;10(6):2730–2740. doi: 10.1021/acscemneuro.8b00621
79. Park JY, Lansbury PT Jr. Beta-synuclein inhibits formation of alpha-synuclein protofibrils: a possible therapeutic strategy against Parkinson's disease. *Biochemistry.* 2003;42(13):3696–3700. doi: 10.1021/bi020604a EDN: MEOTWD
80. Shaltiel-Karyo R, Frenkel-Pinter M, Egoz-Matia N, et al. Inhibiting α -synuclein oligomerization by stable cell-penetrating β -synuclein fragments recovers phenotype of Parkinson's disease model flies. *PLoS One.* 2010;5(11):e13863. doi: 10.1371/journal.pone.0013863 EDN: NZXGWF
81. Preston GW. Different directions for retro-inverso peptides. *J Pept Sci.* 2022;28(6):e3384. doi: 10.1002/psc.3384
82. Liang Z, Chan HYE, Lee MM, Chan MK. A SUMO1-derived peptide targeting SUMO-interacting motif inhibits α -synuclein aggregation. *Cell Chem Biol.* 2021;28(2):180–190.e6. doi: 10.1016/j.chembiol.2020.12.010 EDN: ACHKEK

83. Savyon M, Engelender S. SUMOylation in α -synuclein homeostasis and pathology. *Front Aging Neurosci.* 2020;12:167. doi: 10.3389/fnagi.2020.00167 EDN: ITSWOZ
84. Yau TY, Sander W, Eidson C, Courey AJ. SUMO interacting motifs: structure and function. *Cells.* 2021;10(11):2825. doi: 10.3390/cells10112825 EDN: SVRDSN
85. Rezaeian N, Shirvanizadeh N, Mohammadi S, et al. The inhibitory effects of biomimetically designed peptides on α -synuclein aggregation. *Arch Biochem Biophys.* 2017;634:96–106. doi: 10.1016/j.abb.2017.09.015 EDN: KUOIVV
86. Jabbari A, Niknejad A, Allahyarifard N, et al. Development of a peptide inhibitor to prevent alpha-synuclein fibrillization in Parkinson's disease. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics.* 2025;31:68. doi: 10.1007/s10989-025-10728-9
87. Cheruvara H, Allen-Baume VL, Kad NM, Mason JM. Intracellular screening of a peptide library to derive a potent peptide inhibitor of α -synuclein aggregation. *J Biol Chem.* 2015;290(12):7426–7435. doi: 10.1074/jbc.M114.620484
88. Watt KJC, Meade RM, Williams RJ, Mason JM. Library-derived peptide aggregation modulators of parkinson's disease early-onset α -synuclein variants. *ACS Chem Neurosci.* 2022;13(12):1790–1804. doi: 10.1021/acchemneuro.2c00190 EDN: GTQTQP
89. Michnick SW, Ear PH, Manderson EN, et al. Universal strategies in research and drug discovery based on protein-fragment complementation assays. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(7):569–582. doi: 10.1038/nrd2311
90. Ghadiri MR, Granja JR, Milligan RA, et al. Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture. *Nature.* 1993;366(6453):324–327. doi: 10.1038/366324a0
91. Chemerovski-Glikman M, Rozentur-Shkop E, Richman M, et al. Self-assembled cyclic d,l- α -peptides as generic conformational inhibitors of the α -synuclein aggregation and toxicity: in vitro and mechanistic studies. *Chemistry.* 2016;22(40):14236–14246. doi: 10.1002/chem.201601830
92. Kumar S, Hamilton AD. α -Helix mimetics as modulators of A β self-assembly. *J Am Chem Soc.* 2017;139(16):5744–5755. doi: 10.1021/jacs.6b09734
93. Chandra S, Chen X, Rizo J, et al. A broken alpha -helix in folded alpha -Synuclein. *J Biol Chem.* 2003;278(17):15313–15318. doi: 10.1074/jbc.M213128200
94. Bavinton CE, Sternke-Hoffmann R, Yamashita T, et al. Rationally designed helical peptidomimetics disrupt α -synuclein fibrillation. *Chem Commun (Camb).* 2022;58(33):5132–5135. doi: 10.1039/d2cc00212d EDN: VHFEFK
95. Jacobs TM, Williams B, Williams T, et al. Design of structurally distinct proteins using strategies inspired by evolution. *Science.* 2016;352(6286):687–690. doi: 10.1126/science.aad8036
96. Sangwan S, Sahay S, Murray KA, et al. Inhibition of synucleinopathic seeding by rationally designed inhibitors. *Elife.* 2020;9:e46775. doi: 10.7554/eLife.46775
97. Pirhaghi M, Frank SA, Alam P, et al. A penetratin-derived peptide reduces the membrane

- permeabilization and cell toxicity of α -synuclein oligomers. *J Biol Chem.* 2022;298(12):102688. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102688 EDN: FYOAJC
98. Özçelik CE, Beğli Ö, Hınçer A, et al. Synergistic screening of peptide-based biotechnological drug candidates for neurodegenerative diseases using yeast display and phage display. *ACS Chem Neurosci.* 2023;14(19):3609–3621. doi: 10.1021/acschemneuro.3c00248 EDN: ROIYOI
99. Hjelm LC, Paslawski W, Lendel C, et al. Engineered sequestrins inhibit aggregation of pathogenic alpha-synuclein mutants. *Front Immunol.* 2025;16:1574755. doi: 10.3389/fimmu.2025.1574755 EDN: ZEXXZX
100. Kritzer JA, Hamamichi S, McCaffery JM, et al. Rapid selection of cyclic peptides that reduce alpha-synuclein toxicity in yeast and animal models. *Nat Chem Biol.* 2009;5(9):655–663. doi: 10.1038/nchembio.193
101. Popova B, Wang D, Rajavel A, et al. Identification of two novel peptides that inhibit α -synuclein toxicity and aggregation. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:659926. doi: 10.3389/fnmol.2021.659926 EDN: OKATWZ
102. Spencer B, Kim C, Gonzalez T, et al. α -Synuclein interferes with the ESCRT-III complex contributing to the pathogenesis of Lewy body disease. *Hum Mol Genet.* 2016;25(6):1100–1115. doi: 10.1093/hmg/ddv633
103. Nim S, O'Hara DM, Corbi-Verge C, et al. Disrupting the α -synuclein-ESCRT interaction with a peptide inhibitor mitigates neurodegeneration in preclinical models of Parkinson's disease. *Nat Commun.* 2023;14(1):2150. doi: 10.1038/s41467-023-37464-2 EDN: XMHFJC
104. Jin JW, Fan X, Del Cid-Pellitero E, et al. Development of an α -synuclein knockdown peptide and evaluation of its efficacy in Parkinson's disease models. *Commun Biol.* 2021;4(1):232. doi: 10.1038/s42003-021-01746-6 EDN: RCQVQW
105. Doti N, Mardirossian M, Sandomenico A, et al. Recent applications of retro-inverso peptides. *Int J Mol Sci.* 2021;22(16):8677. doi: 10.3390/ijms22168677 EDN: XQTEHY
106. Vaikath NN, Majbour NK, Paleologou KE, et al. Generation and characterization of novel conformation-specific monoclonal antibodies for α -synuclein pathology. *Neurobiol Dis.* 2015;79:81–99. doi: 10.1016/j.nbd.2015.04.009
107. Meade RM, Watt KJC, Williams RJ, Mason JM. A downsized and optimised intracellular library-derived peptide prevents alpha-synuclein primary nucleation and toxicity without impacting upon lipid binding. *J Mol Biol.* 2021;433(24):167323. doi: 10.1016/j.jmb.2021.167323 EDN: KUYFIW
108. Domingues R, Sant'Anna R, da Fonseca ACC, et al. Extracellular alpha-synuclein: Sensors, receptors, and responses. *Neurobiol Dis.* 2022;168:105696. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105696 EDN: UVWDXN
109. Meade R, Allen S, Williams C, et al. An N-terminal alpha-Synuclein fragment binds lipid vesicles to modulate lipid induced aggregation. *Cell Reports Physical Science* 2023;4(9):101563. doi: 10.1016/j.xcrp.2023.101563

110. Kuwahara T, Koyama A, Gengyo-Ando K, et al. Familial Parkinson mutant alpha-synuclein causes dopamine neuron dysfunction in transgenic *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. 2006;281(1):334–340. doi: 10.1074/jbc.M504860200 EDN: OLHHNH
111. Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Lee VM. Addition of exogenous α -synuclein preformed fibrils to primary neuronal cultures to seed recruitment of endogenous α -synuclein to Lewy body and Lewy neurite-like aggregates. *Nat Protoc*. 2014;9(9):2135–2146. doi: 10.1038/nprot.2014.143
112. Ali TT, Merghani M, Al-Azzani M, et al. Rationally designed peptides inhibit the formation of α -synuclein fibrils and oligomers. *Eur J Med Chem*. 2025;289:117452. doi: 10.1016/j.ejmech.2025.117452 EDN: MWPZGR
113. Eyal A, Szargel R, Avraham E, et al. Synphilin-1A: an aggregation-prone isoform of synphilin-1 that causes neuronal death and is present in aggregates from alpha-synucleinopathy patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(15):5917–5922. doi: 10.1073/pnas.0509707103
114. Dovonou A, Bolduc C, Soto Linan V, et al. Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions. *Transl Neurodegener*. 2023;12(1):36. doi: 10.1186/s40035-023-00368-8 EDN: VLTHJJ
115. Shearman MS, Ragan CI, Iversen LL. Inhibition of PC12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanism of beta-amyloid-mediated cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(4):1470–1474. doi: 10.1073/pnas.91.4.1470
116. Xue C, Lin TY, Chang D, Guo Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci*. 2017;4(1):160696. doi: 10.1098/rsos.160696 EDN: YWPPAD

ОБ АВТОРАХ AUTHORS' INFO

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author	
<p>* Юдин Михаил Сергеевич; адрес: Россия, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1, стр. 3; ORCID: 0000-0001-6900-469X; eLibrary SPIN: 3019-0450; e-mail: yudin.m@rcpcm.org</p>	<p>* Mikhail S. Iudin; address: 1, Malaya Pirogovskaya st, bldg 3, Moscow, Russia, 119435; ORCID: 0000-0001-6900-469X; eLibrary SPIN: 3019-0450; e-mail: yudin.m@rcpcm.org</p>
<p>Варижук Анна Михайловна, д-р хим. наук; ORCID: 0000-0001-9359-8651; eLibrary SPIN: 9514-4550; e-mail: annavarizhuk@gmail.com</p>	<p>Anna M. Varizhuk, Dr. Sci. (Chemistry); ORCID: 0000-0001-9359-8651; eLibrary SPIN: 9514-4550; e-mail: annavarizhuk@gmail.com</p>

Приложение 1. Примеры пептидных ингибиторов агрегации α Syn, полученных с использованием типовых стратегий рационального дизайна (1–5) и охарактеризованных *in tube* (ThT-тест), а также в клеточных и/или животных моделях болезни Паркинсона

Supplement 1. Examples of Peptide Inhibitors of α Syn Aggregation Obtained Using Typical Rational Design Strategies (1–5) and Characterized *In Tube* (ThT Test) and in Cellular and/or Animal Models of Parkinson Disease

Пептид	Стратегия дизайна*	Мишень	Последовательность	Эффект	Источник
Пептиды, активность которых показана <i>in vivo</i>					
Tat- β S-degron	2	NTR	<u>YGRKRRRQRRR</u> <u>TKSGVYLVGRRRG</u> (подчёркивание — Tat; курсив — производное β Syn, жирный шрифт — «дегрон»)	Восстановление моторных функций у трансгенных мышей линии M83 с экспрессией α Syn-A53T после предварительной интрацеребральной инъекции экзогенных фибрилл при внутрибрюшинной доставке пептида. Снижение количества патологических включений в срезах мозга мышей M83 и в культуре первичных нейронов. Снижение общей концентрации α Syn в первичных нейронах за счёт активации его деградации	[1]
PDper1.3	5	CTR	DEEIERQLKALG	Восстановление моторных функций у трансгенных крыс после AAV-опосредованной доставки гена α Syn-A53T и PDper1.3 инъекцией в чёрную субстанцию. Снижение количества патологических включений в срезах мозга крыс и в культуре нейронов; снижение общей концентрации α Syn за счёт активации лизосомной деградации. Восстановление морфологии нейритов в <i>Caenorhabditis elegans</i> с экспрессией α Syn-A30P	[2]
SUMO1	3	NTR	DKKEGEYIKLKVI GQDSSEIHFKVK MTTHLKCLKESY CQRQ	Восстановление моторных функций и зрительной функции у трансгенных <i>Drosophila melanogaster</i> с экспрессией α Syn в нервной ткани и в сетчатке соответственно. Снижение количества агрегатов в клетках SH-SY5Y и восстановление выживаемости клеток с 60 до 95% при концентрации пептида 0,1 мкМ. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (140 мкМ раствора в псевдофизиологическом буфере) на 90% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:1	[3]
β S36 retro-inverso	2	NTR	D- (RTKSGVYLVG)	Восстановление моторных функций и зрительной функции у трансгенных <i>D. melanogaster</i> с экспрессией α Syn-A53T в нервной ткани. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (50 мкМ) на 98% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:20	[4]
KEQPTN	1, 2	NAC	KEQPTN	Восстановление выживаемости клеток SH-SY5Y, обработанных экзогенными агрегатами α Syn (70 мкМ в пересчёте на мономер), с 50 до 95% при соотношении белок:пептид 1:1. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (100 мкМ) более чем на 80% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 2:1	[5]
4554 W	3	NTR (preNAC)	KDGIVNGVKA	Восстановление выживаемости клеток PC12, обработанных экзогенными агрегатами α Syn (5 мкМ в пересчёте на мономер), с 15 до 85% при соотношении белок:пептид 1:1. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (100 мкМ) более чем на 90% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:10	[6]
4654 W	3	NTR (preNAC)	DGIVAGVKA	Восстановление выживаемости клеток SH-SY5Y, обработанных экзогенными агрегатами α Syn (100 мкМ в пересчёте на мономер) с 80 до 100% при соотношении	[7]

				белок:пептид 1:5. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (100 мкМ) на 98% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:10	
S37	5	NAC	GAVVWGVTAVK K K K K	Снижение количества агрегатов в клетках НЕК 293, стабильно экспрессирующих α Syn и обработанных экзогенными агрегатами α Syn (2,5 мкМ в пересчёте на мономер), на 60% при соотношении белок:пептид 1:10. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (50 мкМ) на 90% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:10	[8]
S61	5	NAC	GAVVWGVTAVG R K K R R Q R R R P Q	Снижение количества агрегатов в клетках НЕК 293, стабильно экспрессирующих α Syn и обработанных экзогенными агрегатами α Syn (2,5 мкМ в пересчёте на мономер), на 30% при соотношении белок:пептид 1:10. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (50 мкМ) на 80% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:2	[8]
Пептиды, активность которых показана на клеточных культурах					
S62	5	NAC	GAVVWGVTAVK K G R K K R R Q R R R P Q	Снижение количества агрегатов в клетках НЕК 293, стабильно экспрессирующих α Syn и обработанных экзогенными агрегатами α Syn (2,5 мкМ в пересчёте на мономер), на 80% при соотношении белок:пептид 1:10. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (50 мкМ) на 90% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:1.	[8]
S71	5	NAC	YGRKKRRQRRRA V V T V T A V A E	Снижение количества агрегатов в клетках НЕК 293, стабильно экспрессирующих α Syn и обработанных экзогенными агрегатами α Syn (2,5 мкМ в пересчёте на мономер), на 60% при соотношении белок:пептид 1:10. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (50 мкМ) на 70% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:10	[8]
NTR-TP-L	1	NTR	GVLVVGSAib	Восстановление выживаемости клеток Caco-2, обработанных экзогенными агрегатами α Syn (100 мкМ в пересчёте на мономер) с 45 до 85% при соотношении белок:пептид 1:5. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (50 мкМ) на 95% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:5	[9]
NTR-TP-D	1	NTR (P1-сайт)	D-(GVLVVGSAib)	Восстановление выживаемости клеток Caco-2, обработанных экзогенными агрегатами α Syn (100 мкМ в пересчёте на мономер) с 45 до 90% при соотношении белок:пептид 1:5. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (50 мкМ) на 95% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:5	[9]
NAC-TP-D	1	NAC	D-(VAQKTV)-Aib	Восстановление выживаемости клеток Caco-2, обработанных экзогенными агрегатами α Syn (100 мкМ в пересчёте на мономер) с 45 до 70% при соотношении белок:пептид 1:5. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (50 мкМ) на 50% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:5	[9]
T02	5	NAC	LKEFLKRWARLL R W	Снижение количества агрегатов α Syn в клетках H4, экспрессирующих α Syn и синфилин-1, при концентрации пептида 10 мкМ. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (20 мкМ) на 85% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:2	[10]
T05	5	NAC	LNIRVFLVWGCL R G S A Y F L	Снижение количества агрегатов α Syn в клетках H4, экспрессирующих α Syn и синфилин-1, при концентрации пептида 10 мкМ. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (20 мкМ) более чем на 50% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:2	[10]

PQQ- α Syn36- 46	1	NTR (P1- сайт)	GVLYVGSKTKE	Восстановление выживаемости клеток U2-OS, обработанных экзогенными агрегатами α Syn (10 мкМ в пересчёте на мономер) с 40–60 до 70–90% при соотношении белок:пептид 1:2. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (50 мкМ) на 60% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:10	[11]
p216	5	—	WFQNRMKWKK	Восстановлено 20% жизнеспособности клеток SH-SY5Y, обработанных экзогенными агрегатами α Syn (10 мкМ в пересчёте на мономер) с 60 до 80% при соотношении белок:пептид 1:10. Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (70 мкМ) на 30% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:3	[12]
Пептиды, активность которых показана исключительно на рекомбинантном α Syn					
T72P- 6mer	1, 2	NAC	PGVTAV	Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (350 мкМ) на 90% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:5	[13]
KISFRV	2, 3	NAC	KISFRV	Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (75 мкМ) на 90% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:5	[14]
GQTYV LP	2, 3	NTR (preNA C)	GQTYVLP	Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (75 мкМ) на 80% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:40	[14]
α Syn1- 25	1	NTR	MDVFMKGLSKA KEGVVAAAЕКТК QG	Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (100 мкМ) на 80% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:10	[15]
VAQKT mV	1	NAC	VAQKTmV	Снижение агрегации рекомбинантного α Syn (70 мкМ) на 60% по данным ThT-теста при соотношении белок:пептид 1:1	[16]

Примечание: NTR — N-terminal region (N-концевой участок); CTR — C-terminal region (C-концевой участок, фрагмент); NAC — non-amyloidogenic component (неамилоидогенный компонент, центральный участок белка альфа-синуклеина; остатки 61–95); preNAC — участок белка альфа-синуклеина (остатки 46–56); AAV — adeno-associated dependoparvovirus A (аденоассоциированный вектор); * 1 — отбор и оптимизация фрагментов самого α Syn; 2 — отбор и оптимизация фрагментов гомологов α Syn; 3 — отбор и оптимизация фрагментов белков-партнеров α Syn; 4 — дизайн на основе искусственных каркасов; 5 — дизайн *de novo* и селекция из библиотек случайных последовательностей.

РИСУНКИ

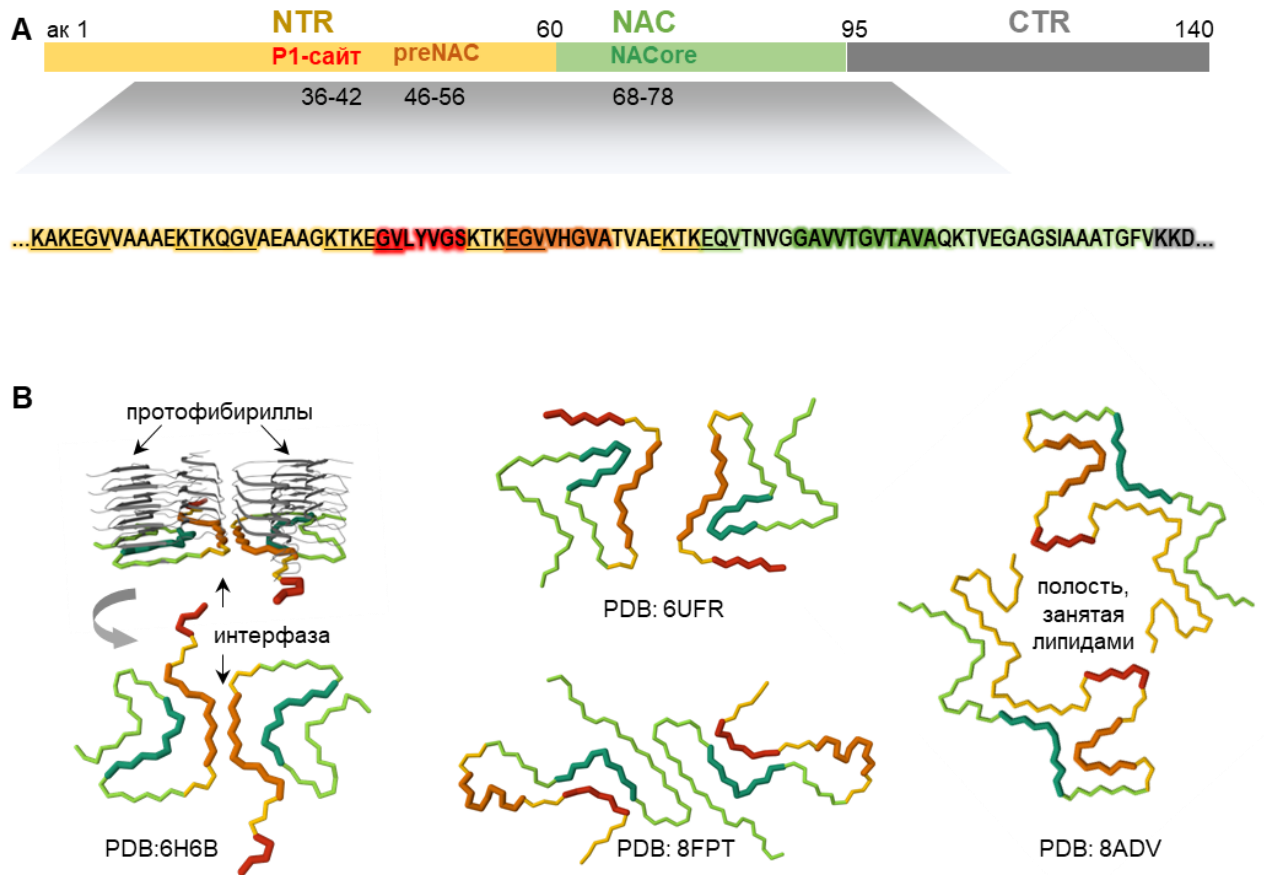


Рис. 1. Структура альфа-синуклеина и его агрегатов. (A) Схематичное представление N-концевого участка (NTR), центрального гидрофобного участка (NAC) и C-концевого участка (CTR). В нижней панели показана последовательность ключевых участков, определяющих агрегацию с образованием фибрилл амилоидного типа: сайт первичных контактов с липидами P1 (красный) и сайт скопления патогенных мутаций preNAC (оранжевый) в NTR (желтый), а также формирующий ключевые контакты в кросс-бета ядре фибрилл участок NACore (зеленый) в NAC (салатовый). Подчеркнуты имперфектные повторы, определяющие конкурирующий с амилоидизацией переход в альфа-спиральную форму при взаимодействии с липидами. (B) Конформационный полиморфизм фибрилл. Показаны примеры поперечного сечения фибрилл, полученных в растворах синуклеина дикого типа (PDB: 6H6B) и его мутанта E46K (PDB: 6UFR), а также фибрилл, полученных в присутствии липидов (PDB: 8ADV) или выделенных из телец Леви (PDB: 8FPT).

Fig. 1. Structure of alpha-synuclein and its aggregates. (A) Schematic representation of the N-terminal region (NTR), central hydrophobic region (NAC), and C-terminal region (CTR). The lower panel shows key regions determining aggregation with the formation of amyloid-type fibrils: the site of primary contacts with lipids P1 (red) and the site of accumulation of pathogenic mutations preNAC (orange) in NTR (yellow), as well as the NACore region (green) that forms key contacts in the cross-beta core of fibrils in NAC (light green). Imperfect repeats determining the transition to the alpha-helical form upon interaction with lipids, which competes with amyloidization, are underlined. (B) Conformational polymorphism of fibrils. Shown are examples of cross-sections of fibrils obtained in solutions of wild-type synuclein (PDB: 6H6B) and its mutant E46K (PDB: 6UFR), as well as fibrils

obtained in the presence of lipids (PDB: 8ADV) or isolated from Lewy bodies (PDB: 8FPT).

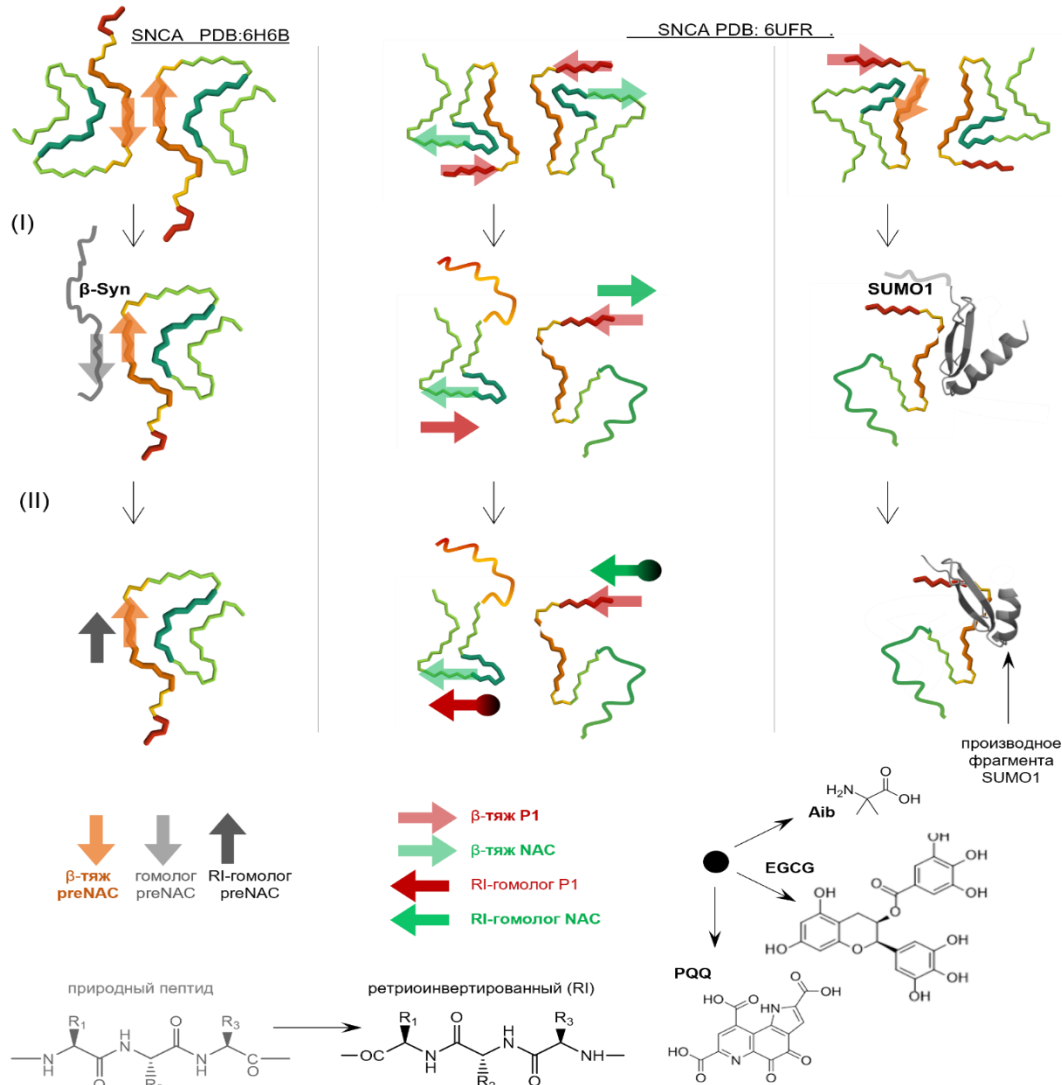


Рис. 2. Дизайн ингибиторов агрегации синуклеина на основе его фрагментов, гомологов и белков-партнеров. Слева - ингибиторы, нацеленные на NTR (конкуренты preNAC), на основе гомолога α Syn – β Syn. В центре - ингибиторы, нацеленные на NTR и NAC (конкуренты ближайшего к NACore фрагментов NAC или P1, соответственно) на основе фрагментов самого α Syn. Справа - нацеленных на NTR (P1 и/или preNAC) ингибиторов на основе SUMO1. Этапы дизайна: (I) выбор белка и его фрагментов, аффинных к бета-тяжам в составе фибрилл, в качестве основы синтетических пептидов; (II) поиск минимальных аффинных к мишени фрагментов и их оптимизация: мутагенез, модификация остова или введение концевых модификаций. Внизу - ретро-инверсия (RI): обращение последовательности и конфигурации остова ($L \rightarrow D$), а также конъюгация с остатками блокатора бета-укладки Aib (аминоизобутират) и полифенольных ингибиторов амилоидизации PQQ (пирролидонхинолинон) и EGCG (галлат эпигаллокатехина).

Fig. 2. Design of synuclein aggregation inhibitors based on its fragments, homologs, and partner proteins. On the left - NTR-targeted inhibitors (preNAC competitors) based on the α Syn homolog beta-synuclein (β Syn). The central panel - NTR- and NAC-targeted inhibitors (competitors of the NACore-neighboring fragment, NAC or P1, respectively), based on fragments of α Syn. On the right

-- SUMO1-based NTR-targeted (P1 and/or preNAC) inhibitors. Design stages: (I) selection of a protein and its fragments with affinity for beta-strands within fibrils as the basis for synthetic peptides; (II) search for minimal target-affinity fragments and their optimization: mutagenesis, backbone modification, or introduction of terminal modifications. The lower panel -- retro-inversion (RI): reversal of the sequence and backbone configuration (L → D), as well as conjugation with residues of the beta-fold blocker Aib (aminoisobutyrate) and the polyphenolic amyloidization inhibitors PQQ (pyrroloquinoline quinolinone) and EGCG (epigallocatechin gallate).

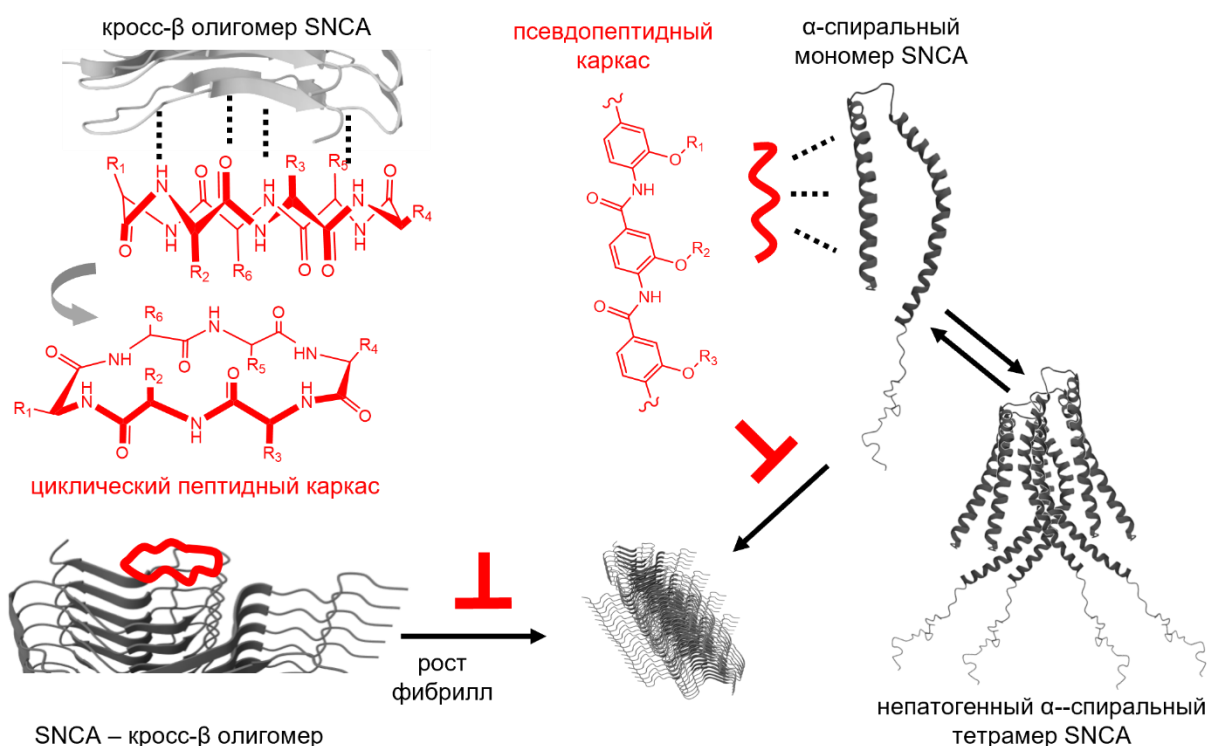


Рис. 3. Дизайн ингибиторов агрегации синуклеина на основе искусственных (псевдо)пептидных каркасов. Слева схематично представлен дизайн ингибиторов, нацеленных на торцевые участки фибриллы, на основе циклических пептидов (неприродных, с чередованием L- и D-конфигураций). Для них ожидается нарушение регулярной структуры фибрилл и блокирование их роста. Справа показан дизайн ингибиторов, нацеленных на не входящие в ядро фибриллы фрагменты NTR, на основе пептидомиметиков с бензамидным остовом. Для них ожидается стабилизация непатогенной конформации α Syn (в мономерной или тетрамерной форме) за счет спираль-спиральных взаимодействий. Оптимизация в обоих случаях включает подбор заместителей (R) в (псевдо)пептидном каркасе для повышения аффинности и специфичности к целевому участку α Syn.

Fig. 3. Design of synuclein aggregation inhibitors based on artificial (pseudo)peptide scaffolds. On the left is a schematic representation of the design of inhibitors targeting fibril end regions, based on cyclic peptides (unnatural, with alternating L- and D-configurations). These are expected to disrupt the regular fibril structure and block their growth. On the right is the design of inhibitors targeting non-core NTR fragments, based on peptidomimetics with a benzamide backbone. These are expected to stabilize the non-pathogenic conformation of α Syn (in monomeric or tetrameric form) through helix-helix interactions. Optimization in both cases involves selecting substituents (R) in the (pseudo)peptide scaffold to increase affinity and specificity for the target region of α Syn.

