

ВИГОНТ

Владимир Александрович

**ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ
БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Елена Валентиновна Казначеева

Институт цитологии РАН,

Санкт-Петербург

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Ирина Владимировна Гужова

Институт цитологии РАН,

Санкт-Петербург

кандидат биологических наук

Константин Викторович Большаков

Институт эволюционной физиологии и

биохимии им. И.М. Сеченова РАН,

Санкт-Петербург

Ведущая организация:

Институт физиологии им. И.П.Павлова

РАН, Санкт-Петербург

Защита состоится «25» января 2013 года в 14 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4

Сайт института: www.cytspb.rssi.ru

Адрес электронной почты института: cellbio@incras.ru

Факс института (812) 297-03-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Реферат разослан « ____ » декабря 2012 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Взаимодействие клеток и передача физиологически важных сигналов от плазматической мембраны клетки к ее органеллам происходит путем активации многочисленных специфических рецепторов, локализованных в плазматической мембране. При активации одного из наиболее распространенных сигнальных каскадов, а именно фосфатидилинозитольного (IP_3 -каскад), наблюдается временное повышение концентрации свободных ионов кальция в цитозоле. Ионы кальция, в свою очередь, являются одним из универсальных вторичных посредников для передачи сигнала внутри клетки.

В состоянии покоя концентрация кальция в цитозоле поддерживается на очень низком уровне, порядка 10^{-7} М (Parekh et al., 2005). Столь низкая концентрация достигается за счет функционирования АТФаз, выкачивающих кальций из цитозоля в депо и во внеклеточное пространство, а также Na^+/Ca^{2+} и Ca^{2+}/H^+ обменников (Safaroli et al., 2000; Болдырев и др, 2006). При различных видах стимуляции концентрация ионов кальция в цитозоле может увеличиваться примерно на порядок, достигая микромолярных значений (Ткачук, 2001). Основными путями повышения концентрации цитозольного кальция являются выброс кальция из внутриклеточных депо и вход кальция через каналы плазматической мембраны.

Один из наиболее общих типов притока кальция из внеклеточной среды – депо-управляемый кальциевый вход. Для его активации необходимо понижение концентрации кальция во внутриклеточных депо. Доминирующей гипотезой передачи сигнала от опустошенного депо к каналам плазматической мембраны является гипотеза конформационного сопряжения, предполагающая прямое взаимодействие между белками эндоплазматического ретикулума (ЭР) и белками плазматической мембраны (ПМ) (Parekh et al., 2005; Wang et al., 2009). Основные белки, принимающие участие в депо-управляемом кальциевом ответе, – локализованные в мембранах ЭР белки STIM (кальциевые сенсоры ЭР) и IP_3R (отвечает за выброс кальция из депо), а также белки ПМ, формирующие ионные поры каналов, а именно белки семейств TRPC и Orai (Wang et al., 2009; Hasan et al., 2010; Manjarres et al., 2010; Gruszczynska-Biegala et al., 2011). Наличие депо-управляемого кальциевого входа показано как для электроневозбудимых клеток (Poggioli et al., 1982), так и для нейронов (Bourgon et al., 2005).

Нарушения в работе кальциевых ионных каналов связаны с множеством различных заболеваний и патологий, таких, например, как диабет (Graham et al., 2012) или латеральный амиотрофический склероз (Pieri et al., 2012).

Болезнь Хантингтона (БХ) является аутосомно-доминантным нейродегенеративным заболеванием, вызываемым увеличением числа глутамин-кодирующих повторов в первом экзоне гена белка хантингтина. В норме длина полиглутаминового тракта не должна превышать 35 остатков глутамина, в то время как при заболевании наблюдаются тракты длиной до 90 и более глутаминов (Vonsattel et al., 1985). В первую очередь при болезни Хантингтона поражаются срединные шипиковые нейроны стриатума. Тем не менее, связь между экспрессией мутантного хантингтина и процессами дегенерации нейронов до сих пор остается неясной.

Одной из токсических функций мутантного хантингтина является дестабилизация кальциевой сигнализации. Ранее показано, что мутантный хантингтин способен напрямую связываться с С-концом IP_3R1 . Такое связывание увеличивает аффинность IP_3R1 к своему лиганду, что может приводить к опустошению внутриклеточных кальциевых депо в ответ на базальные концентрации IP_3 в цитозоле (Tang et al., 2003). Показано также, что экспрессия мутантного хантингтина вызывает усиление функции NR2B-содержащего рецептора NMDA (Zeron et al., 2002) и воздействует на потенциал-зависимые кальциевые каналы (VGCC) (Kaltenbach et al., 2007). Все вышеперечисленные пути ведут к повышению концентрации ионов кальция в цитозоле, что ведет к аномальному накоплению кальция в митохондриях (Bossy-Wetzel et al., 2008; Panov et al., 2002), активации кальпаинов (Vosler et al., 2008), патологическому запуску кальций-зависимых сигнальных путей, апоптотической активности и дегенерации нейронов стриатума.

Одним из механизмов повышения концентрации свободных ионов кальция в нейронах является вход кальция через депо-управляемые каналы ПМ (Bougon et al., 2005). Поскольку увеличение аффинности IP_3R1 к IP_3 напрямую влияет на заполненность внутриклеточных кальциевых депо, логично предположить, что депо-управляемый вход кальция вовлечен в патогенез БХ. Тем не менее, до сих пор не было показано, как экспрессия мутантного хантингтина влияет на депо-управляемый кальциевый вход.

Цели и задачи исследования

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния экспрессии мутантного хантингтина на депо-управляемый вход кальция в клетках нейробластомы человека SK-N-SH и в клетках первичной культуры нейронов стриатума мыши MSN. Были поставлены следующие задачи:

1. Определить влияние экспрессии мутантного белка хантингтина с длиной полиглутаминового тракта 138 остатков глутамина (Htt138Q) на уровень депо-управляемого входа кальция в клетки SK-N-SH.

2. Определить влияние экспрессии N-концевого фрагмента белка хантингтина, содержащего полиглутаминовый тракт длиной 138 остатков глутамина (Htt138Q-1exon), на уровень депо-управляемого входа кальция в клетки MSN.
3. Исследовать действие на депо-управляемый вход кальция в клетках SK-N-SH соединения EVP4593 (ингибитор активации NF-κB сигнального пути).
4. Исследовать действие соединения EVP4593 на депо-управляемый вход кальция в клетках MSN.
5. Выяснить, какие белки ответственны за вход кальция по депо-управляемому механизму в клетках SK-N-SH.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В клеточных моделях болезни Хантингтона: в клетках нейробластомы человека (SK-N-SH) и шипиковых нейронах стриатума мыши (MSN), наблюдается аномально-большой депо-управляемый вход кальция.
2. Соединение EVP4593 способно снижать амплитуду депо-управляемых кальциевых токов в клетках SK-N-SH и MSN.
3. В клетках SK-N-SH за депо-управляемый вход кальция отвечают, в основном, каналы, содержащие белок TRPC1 как субъединицу канала и нуждающиеся в присутствии сенсора кальция в ЭР, белка STIM1.

Научная новизна исследования

В настоящей работе впервые продемонстрировано влияние экспрессии мутантного хантингтина на уровень депо-управляемого входа кальция в клетках SK-N-SH и MSN. Показано наличие аномально большого депо-управляемого входа кальция в клетках SK-N-SH и MSN, моделирующих БХ. Впервые показана способность соединения EVP4593 влиять на депо-управляемый вход кальция в указанных типах клеток. Показано также, что депо-управляемый вход кальция в клетки SK-N-SH Htt138Q опосредуется, в основном, каналами, содержащими белок TRPC1 и требующими присутствия сенсора кальция в ЭР, белка STIM1.

Теоретическое и практическое значение работы

По данным Всемирной организации здравоохранения в мире постоянно растет число людей, страдающих от различных нейродегенеративных заболеваний. Изучение большинства из них представляет немалую сложность, учитывая их спорадический характер и необходимость моделировать возрастные изменения. Именно поэтому во всем мире

уделяется большое внимание изучению молекулярных механизмов БХ, так как это заболевание является на 100% наследственным и достаточно легко моделируется. Расшифровка молекулярных причин БХ может дать толчок к развитию терапевтических подходов для лечения других нейродегенеративных заболеваний, как связанных, так и не связанных с полиглутаминовой экспансией.

Некоторые результаты настоящей работы позволяют надеяться на разработку лекарственного средства, которое можно будет использовать в терапии людей, страдающих от БХ и, возможно, других полиглутаминовых заболеваний.

Данное фундаментальное исследование вносит также вклад в общую картину кальциевой сигнализации, а именно в понимание организации и функционирования депо-управляемых кальциевых каналов.

Апробация работы

Основные положения работы доложены и обсуждены на «II Конференции молодых ученых Института цитологии РАН» (Санкт-Петербург, 2010); 14-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология–наука XXI века» (Пушино, 2010); Политехническом симпозиуме: «Молодые учёные – промышленности Северо-Западного региона», (Санкт-Петербург, 2010); «XXI Физиологическом съезде» (Калуга, 2010); 15-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология–наука XXI века» (Пушино, 2011); I Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет», (Санкт-Петербург, 2011); Конференции «Молекулярная и клеточная биология: прикладные аспекты», (Москва, 2012); «III Конференции молодых ученых Института цитологии РАН» (Санкт-Петербург, 2012); семинарах лаборатории ионных каналов клеточных мембран Института цитологии РАН.

По результатам диссертации опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных журналах из перечня изданий, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 82 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы. Материал иллюстрирован 23 рисунками. Библиографический указатель содержит 160 источников.

Личный вклад автора

Все экспериментальные процедуры и обработка результатов выполнены автором лично. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Финансовая поддержка работы

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (ГК ПЗ32, ГК 14.740.11.0924), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 11-04-12047, 10-04-01002, 10-04-00956), НШ-3796.2010.4, компании ОПТЭК (грант в поддержку молодых ученых), Правительства Санкт-Петербурга.

Материалы и методы

Клетки. Клетки нейробластомы человека SK-N-SH (любезно предоставлены лабораторией Б.А. Маргулиса, Институт цитологии РАН) культивировали в среде DMEM с добавлением 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота и антибиотика (80 мкг/мл гентамицина). За 1-2 сут. до начала эксперимента клетки высевали на фрагменты покровных стекол (3 × 3 мм). Для лучшей адгезии клеток стекла покрывали 0.01%-ным раствором полилизина.

Соединения EVP. EVP4593 (6-амино-4-(4-феноксифенетиламино)хиназолин) и EVP14808 (6-амино-4-(2-(3-пиридил)этиламино)хиназолин) описаны в опубликованных ранее работах (Tobe et al., 2003). Соединения EVP любезно предоставлены компанией «EnVivo Inc» (США).

Трансфекция и РНК интерференция. Мутантный хантингтин экспрессировали в клетках SK-N-SH с использованием конструкции на основе вектора cPI (Promega, США), содержащей Htt138Q (последовательность, кодирующая белок хантингтин с 138 остатками глутамина). Htt138Q встраивали в вектор cPI, обладающий устойчивостью к неомицину, по XbaI/EcoR1-сайтам. В контрольных экспериментах использовали плазмиду cPI, содержащую Htt15Q (последовательность, кодирующая нормальный хантингтин с 15 остатками глутамина). Трансфицированные клетки визуализировали при помощи котрансфекции с зеленым флуоресцентным белком (GFP) (соотношение Htt : GFP = 3 : 1). Котрансфекцию проводили с использованием трансфицирующего агента Унифектин56 (ИБХ, Москва).

В экспериментах с подавлением экспрессии TRPC1 (transient receptor potential canonical 1) использовали котрансфекцию клеток конструкцией для экспрессии хантингтина, плазмидой, несущей малую интерферирующую РНК (siRNA) против TRPC1 (pSHAG-1h

TRPC1 2219, любезно предоставлена Dr. L. Tsiokas, University of Oklahoma Health Science Center), и плазмидой, кодирующей GFP, в соотношении 3 : 3 : 2.

Для гиперэкспрессии TRPC1 в клетках SK-N-SH использовали котранфекцию клеток геном *Trpc1* мыши в составе экспрессионного вектора pcDNA3 (конструкция любезно предоставлена Dr. S. Muallem, NIH, США) и плазмидой, кодирующей GFP, в соотношении 1 : 1.

В контрольных экспериментах использовали плазмиду с siRNA, не имеющей специфической мишени (контрольная siRNA, Sigma, США), и пустой экспрессионный (контрольный) вектор (Sigma, США).

Электрофорез и иммуноблотинг. Клетки выращивали в чашках Петри диаметром 50 мм. После трансфекции клетки лизировали в буферном растворе следующего состава: 10 мМ трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1%-ный тритон X-100, 1%-ный NP40 (Nonidet P40, неионный детергент нонилфенилполиэтиленгликоль), 2 мМ EDTA, 0.2 мМ PMSF (ингибитор сериновых протеаз, фенилметансульфонилфторид) с добавлением ингибиторов протеаз (PIC, Hoffmann-La Roche AG, Германия). Белки лизатов разделяли электрофоретически в 8%-ном полиакриламидном геле (для хантингтина в 6%-ном геле) в вертикальной камере и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Белки на иммуноблоте выявляли с использованием поликлональных антител против TRPC1 (Alomone labs, Израиль, в разведении 1 : 200) и моноклональных антител против хантингтина (Millipore, США, в разведении 1 : 1000). В качестве вторых антител брали антитела козы против константной части иммуноглобулинов кролика (1 : 30000) и антитела козы против константной части иммуноглобулинов мыши (1 : 30000). Белки на иммуноблотах выявляли с помощью субстрата Super Signal Chemiluminescent Substrate (Pierce, США). Эксперименты повторяли как минимум 3 раза, используя различные лизаты клеток. Для контроля равной загрузки дорожек использовали моноклональные антитела против α -тубулина в разведении 1 : 1000 (Sigma, США). Процентное содержание белка сравнивали с помощью стандартной программы сравнения интенсивности окрашивания сканированного иммуноблота.

Получение первичной культуры нейронов стриатума. Детенышей мышей первого дня жизни декапитировали. Стриатум выделяли в охлажденном (4°C) стерильном растворе для препарирования (на 1 литр: 3.9 г NEPEES, 0.84 г NaHCO₃, 100 мл 10X HBSS, 5 мл раствора гентамицина 10 мг/мл, pH 7.4). Затем проводили центрифугирование (2 мин, 1000 g). Супернатант сливали. Для разделения нейронов к осадку добавляли растворы 0.1%-ного трипсина и 0.5%-ной ДНК-азы I. Разделенные нейроны рассеивали по чашкам

Петри с покровными стелами, обработанными 0,01%-ным поли-L-лизинном. Состав среды: Neurobasal-A, 3%-ная FBS, 3%-ный B27, 0.6 мг/мл L-Gln.

Получение лентивируса и инфицирование нейронов. Шаттл-векторы, кодирующие N-концевые фрагменты белков Htt15Q-1exon (147 аминокислот) и Htt138Q-1exon (270 аминокислот), конъюгированные с HA-tag, HIV-1 вектор 8.9 и VSVG плазмиды покровных гликопротеинов для создания лентивирусов были предоставлены профессором И. Б. Безпрозванным (UT Southwestern Medical Center, США). Вирусы Lenti-Htt15Q-1exon и Lenti-Htt138Q-1exon созданы посредством котрансфекции шаттл-векторов с HIV-1 вектором 8.9 (Δ 8.9) и VSVG плазмид покровных гликопротеинов в пакующую клеточную линию НЕК293Т. После добавления раствора для трансфекции в среду чашки Петри с клетками инкубировали в термостате в течение 24 ч при температуре 37°C, а затем 72 часа при температуре 32°C. За это время упакованные вирусы выделялись клетками в среду. По истечению срока инкубации среда с вирусами была отфильтрована (\varnothing 0.45 мкм) и немедленно заморожена в жидком азоте. Хранение производилось при минус 80°C.

Для определения титра вируса использовался метод иммуноокрашивания с антителами к HA-tag. Долю инфицированных клеток от числа всех клеток на стекле определяли визуально с помощью микроскопа Pascal. В результате проверки эффективности инфицирования при измерении доли светящихся клеток выбиралось то соотношение среды с вирусом к среде культивирования, которое давало минимальную эффективность 90%.

Инфицирование нейронов проводили на 5-е сутки в культуре. К клеткам добавлялась культуральная среда с количеством лентивируса, дающим минимальную эффективность трансфекции 90%.

Электрофизиологические измерения. Ионные токи регистрировали с использованием метода локальной фиксации потенциала в условиях регистрации тока от целой клетки (Hamill, Sakmann, 1981). Измерения выполняли с помощью усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Сопротивление микроэлектродов составляло 5–15 МОм. Последовательное сопротивление не компенсировали. Усиленный и предварительно отфильтрованный встроенным в усилитель двухполюсным фильтром Бесселя (частота среза 500 Гц) сигнал оцифровывали на частоте 5000 Гц с помощью платы АЦП L305 («L-Card», Россия). При записях интегральных токов клетки потенциал мембраны поддерживали при минус 40 мВ. Периодически (каждые 5 с) потенциал на мембране изменяли до минус 100 мВ (на 30 мс), а затем постепенно (с постоянной скоростью 1 мВ/мс) его величину изменяли до +100 мВ. Шаг измерения составлял 0.5 мВ. Записанные токи нормировали относительно

емкости клетки (10–30 пФ). Записи, полученные до активации исследуемых токов, использовали для вычитания тока утечки и тока через другие каналы. Данные на приведенных гистограммах представлены в виде средней величины \pm среднеквадратичное отклонение.

Растворы. В измерениях тока целой клетки раствор регистрирующей пипетки содержал (в mM): 135 CsCl, 10 EGTA-Cs, 10 Hepes-Cs, 4.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 4 Na-ATP, 0.4 Na₂-GTP (pCa7), pH 7.3. Внеклеточный раствор содержал (в mM): 140 NMDG-Asp, 10 BaCl₂, 10 Hepes-Cs, 0.01 тетродотоксина, 0.01 нифедипина, pH 7.3. Для активации депо-зависимых токов во внеклеточный раствор добавляли 1 мкМ тапсигаргина. EVP4593 и EVP14808 добавляли во внеклеточный раствор. Соединения подавали к объекту путем перфузии.

Результаты и обсуждение

(1) В клетках нейробластомы человека SK-N-SH, моделирующих болезнь Хантингтона, наблюдается аномально-большой депо-управляемый вход кальция

Чтобы смоделировать БХ в клетки нейробластомы человека SK-N-SH вводили конструкцию, кодирующую белок хантингтин с полиглутаминовым трактом из 138 остатков глутамина (Htt138Q). Контролем служили интактные клетки (Ctrl) и клетки, экспрессирующие хантингтин с полиглутаминовым трактом из 15 остатков глутамина (Htt15Q), что является нормой. Эффективность трансфекции была подтверждена иммуноблотом (рис. 1).

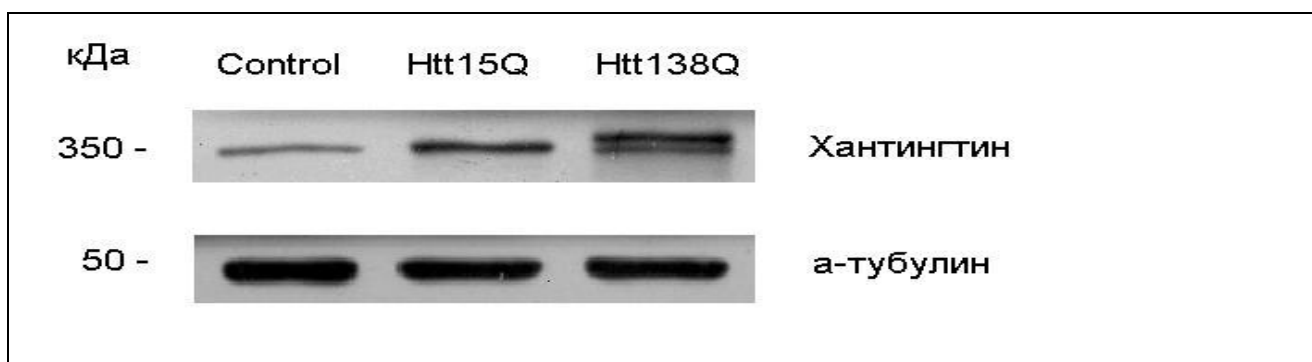


Рис. 1. Иммуноблот, показывающий экспрессию белка хантингтина в интактных клетках SK-N-SH (Control), в клетках, трансфицированных конструкцией для экспрессии Htt15Q, и в клетках, трансфицированных конструкцией для экспрессии Htt138Q.

На приведенном иммуноблоте видно, что выбранная линия клеток SK-N-SH экспрессирует эндогенный хантингтин с нормальной длиной полиглутаминового тракта. При введении в эти клетки конструкции для экспрессии Htt138Q на иммуноблоте отчетливо видна вторая верхняя полоса, соответствующая экспрессии более тяжелой, мутантной формы

хантингтина. Нижняя полоса на иммуноблоте для клеток Htt138Q соответствует эндогенной экспрессии хантингтина с нормальным полиглутаминовым трактом (рис. 1).

Электрофизиологические опыты показали, что примерно у 80% интактных клеткок в ответ на пассивное опустошение депо, вызванное приложением 1 мкМ тапсигаргина, развивался входящий ток со средней амплитудой 0.5 пА/пФ при потенциале -80 мВ (рис. 2а-в). В клетках Htt15Q средняя амплитуда тока была практически такой же, как в интактных клетках (рис. 2а-в). В то же время, регистрация депо-управляемого входа ионов кальция в клетки Htt138Q, служащие моделью болезни Хантингтона, показала приблизительно 5-кратное увеличение тока по сравнению с контролем (рис. 2а-в).

Поскольку считается, что аппликация тапсигаргина ведет к пассивному опустошению депо и не влияет на другие клеточные сигнальные пути, зарегистрированный ток можно приписать работе депо-управляемых каналов. Таким образом, мы показали, что в клетках Htt138Q, моделирующих болезнь Хантингтона, наблюдается аномально большой депо-управляемый вход кальция (Глушанкова и др., 2010).

Нарушение кальциевой сигнализации в нейронах вовлечено в нейродегенеративные процессы. Различные эффекты экспрессии мутантного хантингтина дестабилизируют кальциевую сигнализацию так, что происходит накопление ионов кальция в цитозоле. Данное накопление происходит как за счет увеличения чувствительности IP₃R к своему лиганду (Tang et al, 2003), в результате которого выброс из депо осуществляется в ответ на базальные концентрации IP₃ в цитозоле, так и за счет повышенного входа кальция из внеклеточной среды, например через рецептор NMDA. Такое повышение концентрации кальция в цитозоле создает дополнительную нагрузку на митохондрии, депонирующие излишки кальция. Когда митохондрия становится перегруженной кальцием, это может приводить к активации поры МРТ, выбросу в цитозоль кальция и факторов апоптоза и, соответственно, вести к клеточной гибели. Полученные нами результаты подтверждают факт, что мутантный хантингтин нарушает кальциевую сигнализацию в сторону увеличения концентрации ионов кальция в цитозоле. Нами показано, что пути аномального повышения цитозольного кальция в модели БХ не исчерпываются путями упомянутыми в обзоре литературы, но включают в себя еще и такой распространенный и важный путь притока кальция в клетку, как депо-управляемый кальциевый вход. Аномально большой депо-управляемый вход кальция в клетки еще сильнее дестабилизирует депонирование кальция в клетке, что может приводить к активации МРТ поры митохондрий и вовлечению клеток в апоптоз. Таким образом, полученные нами данные могут свидетельствовать в пользу кальциевой гипотезы БХ.

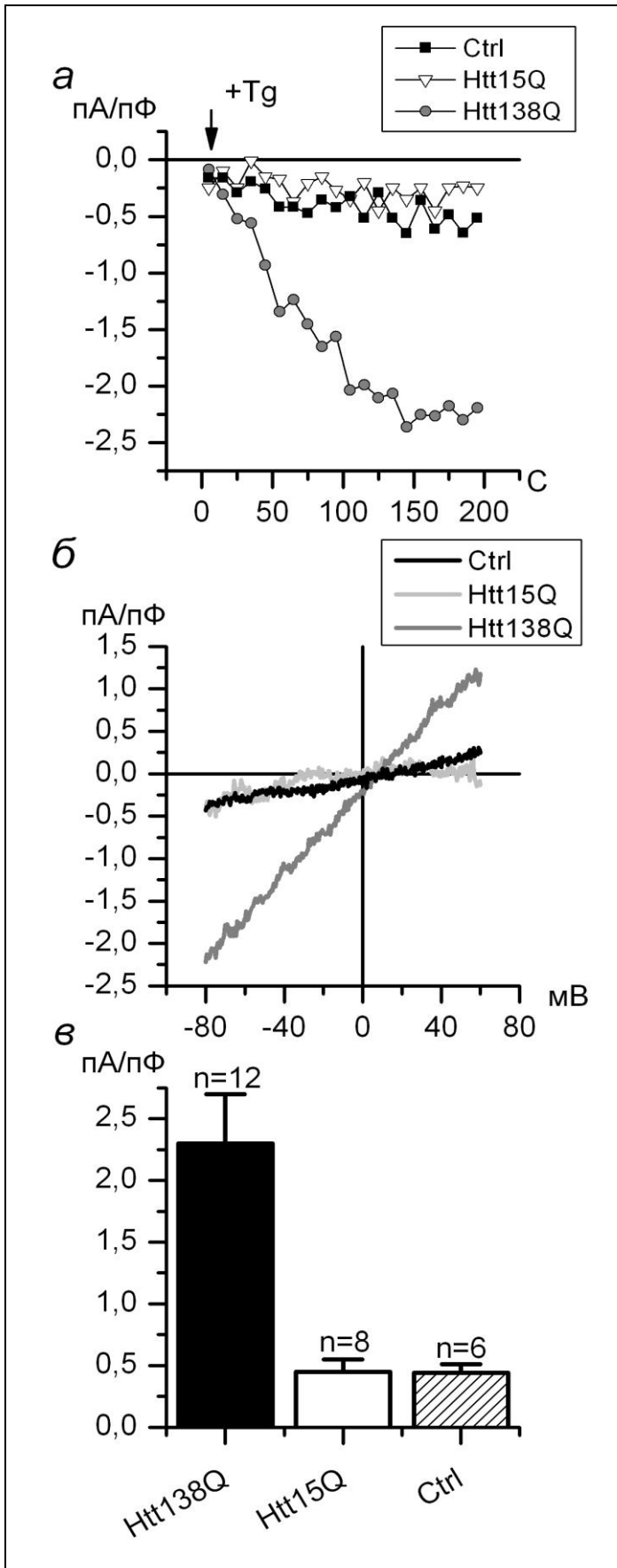


Рис. 2. Влияние экспрессии белков Htt15Q и Htt138Q на депо-управляемый вход кальция в клетках SK-N-SH. *а* – Развитие тока (отнесенного к емкости клетки), вызванное приложением 1 мкМ тапсигаргина в клетках SK-N-SH, экспрессирующих Htt15Q (белые треугольники), Htt138Q (серые круги) и интактных SK-N-SH (Ctrl) (черные квадраты) при потенциале -80 мВ. Представлены данные трех репрезентативных экспериментов. *б* – Средние вольт-амперные характеристики токов, полученных при пассивном опустошении депо тапсигаргином (1 мкМ), в клетках SK-N-SH, экспрессирующих Htt15Q (светло-серая линия), Htt138Q (темно-серая линия) и интактных SK-N-SH (Ctrl) (черная линия) на стационарном уровне активности исследуемых токов. Количество экспериментов указано на панели (в). *в* – Стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале -80 мВ в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в клетках SK-N-SH, экспрессирующих Htt15Q (без заливки), Htt138Q (черная заливка) и интактных SK-N-SH (Ctrl) (штриховка). Уровень достоверности при статистически отличающихся результатах составляет $p < 0.05$.

(2) В клетках первичной культуры нейронов стриатума мыши, моделирующих болезнь Хантингтона, наблюдается аномально-большой депо-управляемый вход кальция

Так как при БХ в первую очередь поражаются срединные шипиковые нейроны стриатума, представлялось важным получить данные о влиянии экспрессии мутантного хантингтина на депо-управляемый кальциевый вход именно в клетках MSN и сравнить их с уже имеющимися данными, полученными на клетках SK-N-SH.

Необходимо отметить, что для моделирования заболевания на клетках MSN использовался не полноразмерный белок хантингтин, а продукт первого экзона гена белка хантингтина, с длинным полиглутаминовым трактом. Такое изменение модели было вызвано тем, что ген полноразмерного хантингтина оказался слишком велик для того, чтобы быть доставленным в клетки с помощью лентивирусной инфекции. А сама процедура заражения лентивирусом для доставки генетического материала в клетки была выбрана в связи с невозможностью трансфицирования нейрональной культуры стандартными методами.

Электрофизиологические опыты показали, что у интактных нейронов в ответ на пассивное опустошение депо тапсигаргином развивался входящий ток со средней амплитудой около 0.8 пА/пФ при потенциале -80 мВ (рис. 3а-в). В клетках Htt15Q-1exon средняя амплитуда тока была около 1 пА/пФ, что практически совпадает с ответом в интактных нейронах (рис. 3а-в). В то же время регистрация депо-управляемого входа ионов кальция в нейроны, экспрессирующие Htt138Q-1exon, показала приблизительно 2-кратное увеличение тока по сравнению с контролем (рис. 3а-в).

Таким образом, в нейронах экспрессия фрагмента мутантного хантингтина также приводит к аномально высокому уровню входа кальция по депо-управляемому механизму.

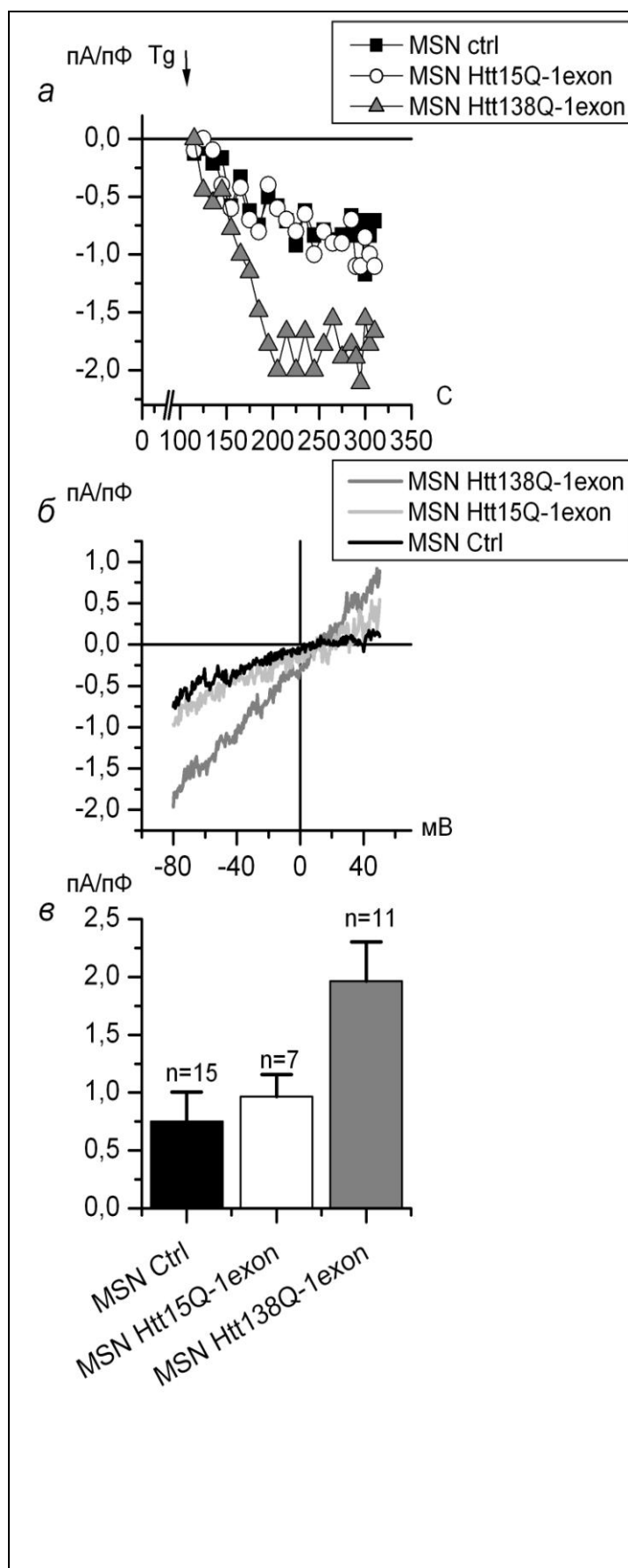


Рис. 3. Влияние экспрессии белков Htt15Q и Htt138Q на депо-управляемый вход кальция в клетках MSN. **а** – Развитие тока (отнесенного к емкости клетки), вызванное приложением 1 мкМ тапсигаргина в клетках MSN, экспрессирующих Htt15Q-1exon (белые круги), Htt138Q-1exon (серые треугольники) и интактных MSN (MSN Ctrl) (черные квадраты) при потенциале –80 мВ. Представлены данные трех репрезентативных экспериментов. **б** – Средние вольт-амперные характеристики токов, полученных при пассивном опустошении депо тапсигаргином (1 мкМ), в клетках MSN, экспрессирующих Htt15Q-1exon (светло-серая линия), Htt138Q-1exon (темно-серая линия) и интактных MSN (MSN Ctrl) (черная линия) на стационарном уровне активности исследуемых токов. Количество экспериментов указано на панели (в). **в** – Стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале –80 мВ в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в клетках MSN, экспрессирующих Htt15Q-1exon (без заливки), Htt138Q-1exon (серая заливка) и интактных MSN (MSN Ctrl) (черная заливка). Уровень достоверности при статистически отличающихся результатах составляет $p < 0.05$.

(3) Соединение EVP4593 способно блокировать аномальный депо-управляемый вход кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q и MSN Htt138Q-1exon

В 2003 году Tobe и соавторы синтезировали структурные аналоги хиназолина (соединения EVP) и показали их способность ингибировать сигнальный путь NF-κB (Tobe et al., 2003). Считается, что сигнальный путь NF-κB может играть непосредственную роль в патогенезе БХ. Действительно, гиперактивацию NF-κB сигнального пути наблюдали в клетках PC12, трансфицированных конструкцией, кодирующей мутантный хантингтин (Khoshnan et al., 2004). Показано также, что различные соединения, оказывающие нейропротекторное действие на нейроны стриатума в модели острой эксцитотоксичности, снижают активность NF-κB (Qin et al., 1998; Nakai et al., 2000). Поскольку для активации сигнального пути NF-κB необходим депо-управляемый вход кальция (Stankunas et al., 1999; Okamura et al., 2001), было выдвинуто предположение, что EVP4593 может воздействовать на этот вход и таким образом снижать активность NF-κB (Choi et al., 2006).

В нашей совместной работе с лабораторией И.Б. Безпрозванного (Dallas, США) и компанией Envivo Pharmaceuticals (Watertown, США) соединение EVP4593 было идентифицировано как агент, оказывающий положительное влияние на *Drosophila melanogaster*, моделирующих БХ, в тестах на моторику, а соединение EVP14808 не оказывало никакого эффекта и, таким образом, может использоваться в качестве негативного контроля (Wu, Shih, Vigont et al., 2011).

Итак, следующей задачей стало исследование влияния EVP4593 и его неактивного аналога EVP14808 на депо-управляемый вход кальция в клетках, экспрессирующих Htt138Q. Результаты электрофизиологических экспериментов, проведенных на клетках SK-N-SH, показали, что добавление 300 нМ EVP4593 приводит к выраженному уменьшению амплитуды (примерно на 60%) депо-управляемых токов, вызванных аппликацией 1 мкМ тапсигаргина в клетках Htt138Q (рис. 4а-в). Следует подчеркнуть обратимость этого уменьшения: при отмывке EVP4593 восстанавливалась активность депо-управляемых каналов (рис. 4а). В то же время, добавление неактивного EVP14808 не оказывало статистически значимого влияния на токи в клетках Htt138Q (рис. 4а-в). Тапсигаргин и EVP растворимы в DMSO, поэтому, чтобы исключить влияние растворителя, были поставлены контрольные опыты. В них использовали клетки Htt138Q, в которых ток вызывали с помощью тапсигаргина, а затем добавляли внеклеточный раствор с тапсигаргином, содержащий DMSO в такой же концентрации, как и в опытах с EVP. Никаких эффектов, связанных с влиянием DMSO, не наблюдали (рис. 4а-в). Таким образом, можно заключить, что EVP4593 специфично блокировал аномальный депо-управляемый кальциевый вход в клетках Htt138Q.

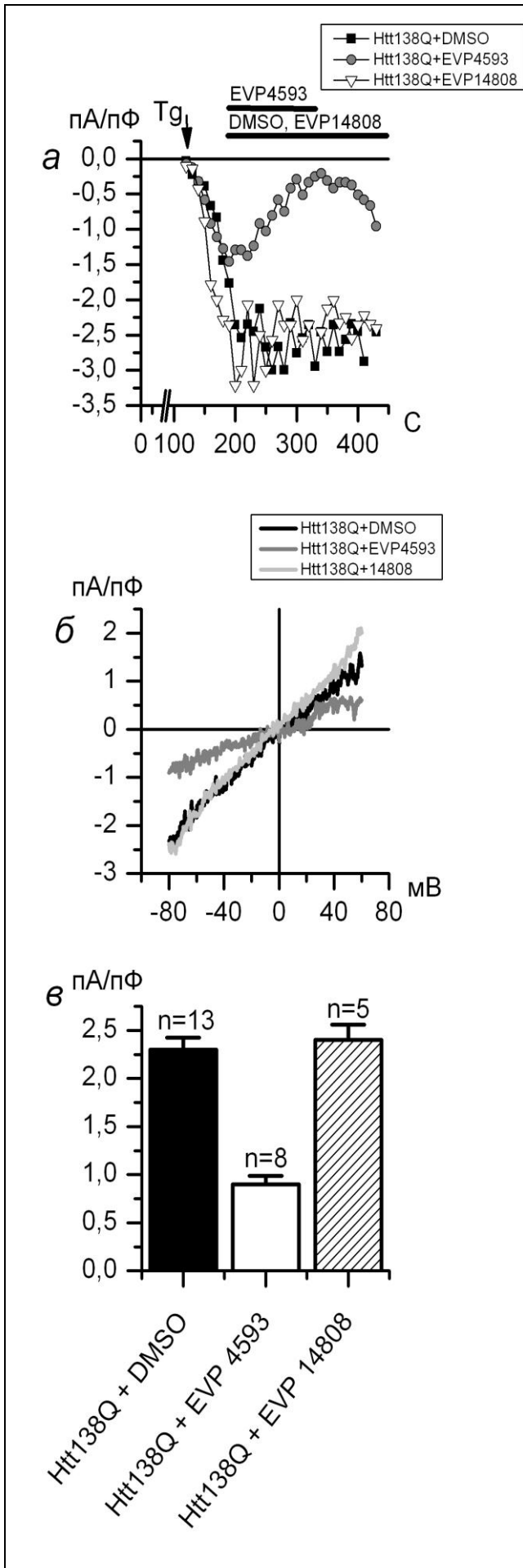


Рис. 4. Влияние соединений EVP на депо-управляемые токи в клетках Htt138Q. а –

Развитие тока (отнесенного к емкости клеток), вызванное приложением 1 мкМ тапсигаргина в клетках Htt138Q при потенциале -80 мВ при добавлении во внешний раствор 0.3% DMSO (Htt138Q+DMSO) (черные квадраты), 300 нМ EVP14808 (Htt138Q+EVP14808) (белые треугольники), 300 нМ EVP4593 (Htt138Q+EVP4593) (серые круги). Время добавления во внешний раствор EVP4593, EVP14808 и DMSO показано линиями над графиком. Представлены данные трех репрезентативных экспериментов.

б – Средние вольт-амперные характеристики токов, полученных при пассивном опустошении депо тапсигаргином (1 мкМ), в клетках Htt138Q на стационарном уровне развития токов при добавлении во внешний раствор 0.3% DMSO (Htt138Q+DMSO) (черная линия), 300 нМ EVP14808 (Htt138Q+EVP14808) (светло-серая линия), 300 нМ EVP4593 (Htt138Q+EVP4593) (темно-серая линия).

Количество экспериментов указано на панели (в). в – Стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале -80 мВ в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в клетках Htt138Q при добавлении во внешний раствор 0.3% DMSO (Htt138Q+DMSO) (черная заливка), 300 нМ EVP14808 (Htt138Q+EVP14808) (штриховка), 300 нМ EVP4593 (Htt138Q+EVP4593) (без заливки). Уровень достоверности при статистически отличающихся результатах составляет $p < 0.05$.

Далее были проведены эксперименты, показывающие, как соединение EVP4593 влияет на депо-управляемый вход кальция в клетках MSN. Результаты электрофизиологических экспериментов показали, что добавление 300 нМ EVP4593 слабо влияло на уровень депо-управляемых токов в нейронах, однако повышение концентрации до 3 мкМ привело к выраженному уменьшению амплитуды (примерно на 60%) депо-управляемых токов, вызванных аппликацией 1 мкМ тапсигаргина в клетках MSN Htt138Q-1exon (рис. 5). Причем получившаяся амплитуда стала сравнимой с амплитудой депо-управляемых токов в контрольных нейронах (рис. 5).

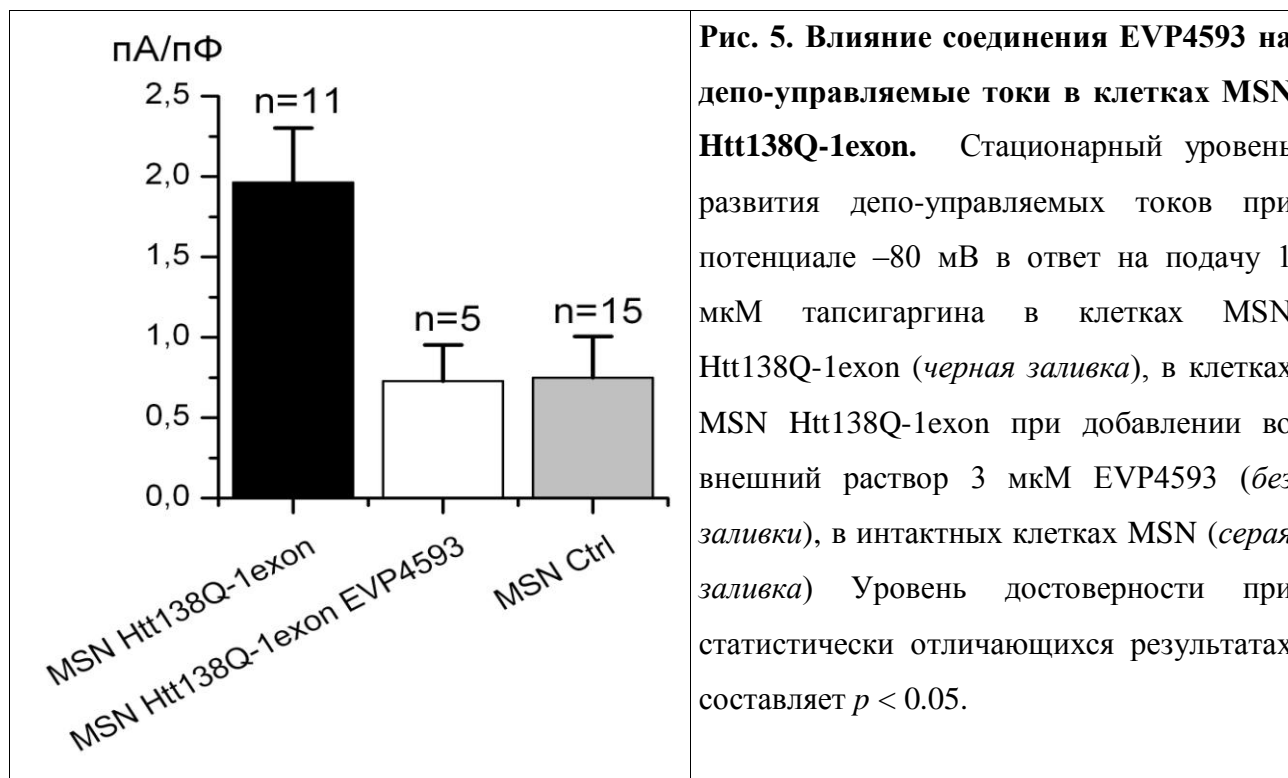


Рис. 5. Влияние соединения EVP4593 на депо-управляемые токи в клетках MSN Htt138Q-1exon. Стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале -80 мВ в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в клетках MSN Htt138Q-1exon (черная заливка), в клетках MSN Htt138Q-1exon при добавлении во внешний раствор 3 мкМ EVP4593 (без заливки), в интактных клетках MSN (серая заливка) Уровень достоверности при статистически отличающихся результатах составляет $p < 0.05$.

Исходя из того, что EVP4593 снижает тапсигаргин-индуцируемые токи как в клетках нейробластомы человека, экспрессирующей мутантный Htt138Q, так и в интактных клетках SK-N-SH, а также в клетках первичной культуры нейронов стриатума мыши, можно предположить, что EVP4593 является новым ингибитором депо-управляемого кальциевого входа. Если эти данные будут подтверждены на других типах клеток, соединение EVP4593 может стать новым инструментом в изучении кальциевой сигнализации.

Необходимо отметить, что обнаруженное нами обратимое ингибирование аномально большого депо-управляемого входа кальция в клетки открывает перспективы в использовании EVP4593 для создания лекарственного препарата, оказывающего терапевтический эффект на людей, страдающих от БХ. Было также показано в наших совместных работах с лабораторией И.Б. Безprozванного нейропротекторное действие EVP4593 на культуру MSN, выделенных из модельных мышей YAC128 (Wu, Shih, Vigont et al., 2011).

(4) Белок TRPC1 входит в состав каналов, отвечающих за поддержание депо-управляемого входа кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q

Молекулярная структура каналов, ответственных за депо-управляемый кальциевый вход, относительно слабо изучена в нервных клетках, однако в качестве потенциальных участников этого входа выделяют белки семейства TRPC и Orail (Berna-Erro et al., 2009; Hasan et al., 2010; Gruszczynska-Biegala et al., 2011). Для каналов, образованных Orail, характерны высокий потенциал реверсии и входящее выпрямление, в то время как каналы TRPC обычно относительно неселективны (Clapham et al., 2002). Полученные вольт-амперные характеристики (рис. 2б), позволяют предположить, что в поддержании депо-управляемого входа кальция в клетках Htt138Q важную роль играет белок TRPC1.

Белок TRPC1 относится к белкам семейства TRPC, представители которого содержат шесть трансмембранных доменов и могут гомо- или гетероолигомеризоваться с формированием ионной поры канала. Показано, что TRPC1 может принимать участие в депо-зависимом входе кальция в клетках различного типа (Wu et al., 2000; Ambudkar et al., 2007; Salido et al., 2009). Показано также, что TRPC1 экспрессируется в клетках нервной системы (Riccio et al., 2002). Ранее обсуждалась потенциальная значимость белков семейства TRPC в таких нейродегенеративных заболеваниях, как болезни Альцгеймера и Паркинсона (Yamamoto et al., 2007; Selvaraj et al., 2010). В частности, показано участие TRPC1-каналов в эксайтотоксической гибели нейронов гиппокампа (Narayanan et al., 2008).

Следующим этапом работы стало определение роли каналообразующего белка TRPC1 в аномально большом депо-управляемом кальциевом ответе в клетках Htt138Q.

С помощью siRNA была подавлена экспрессия белка TRPC1 в клетках Htt138Q примерно на 70%. Эндогенная экспрессия TRPC1 в линии клеток SK-N-SH и эффективность супрессии подтверждена с помощью иммуноблота (рис. 6).

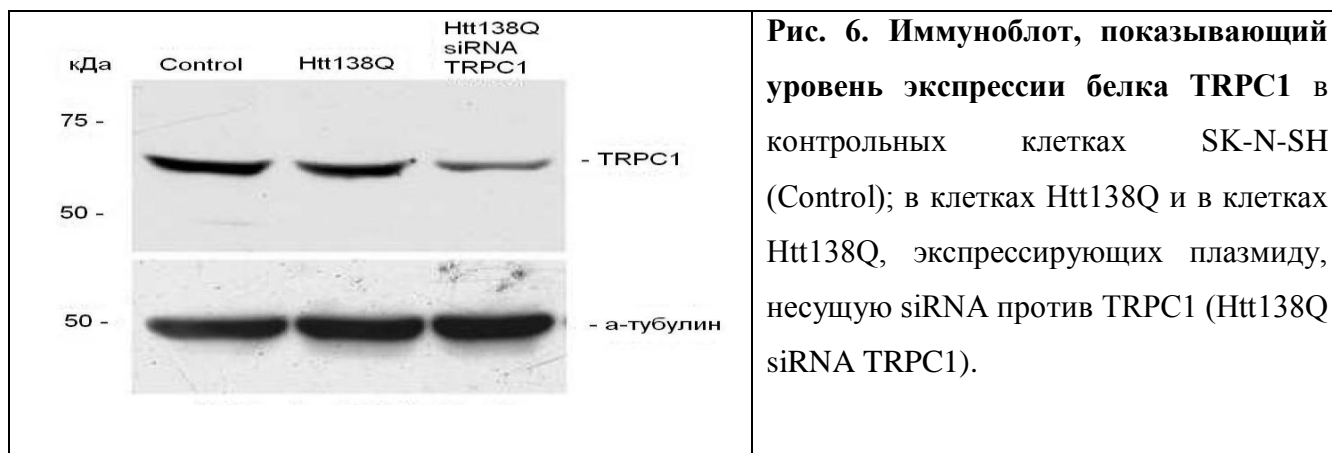
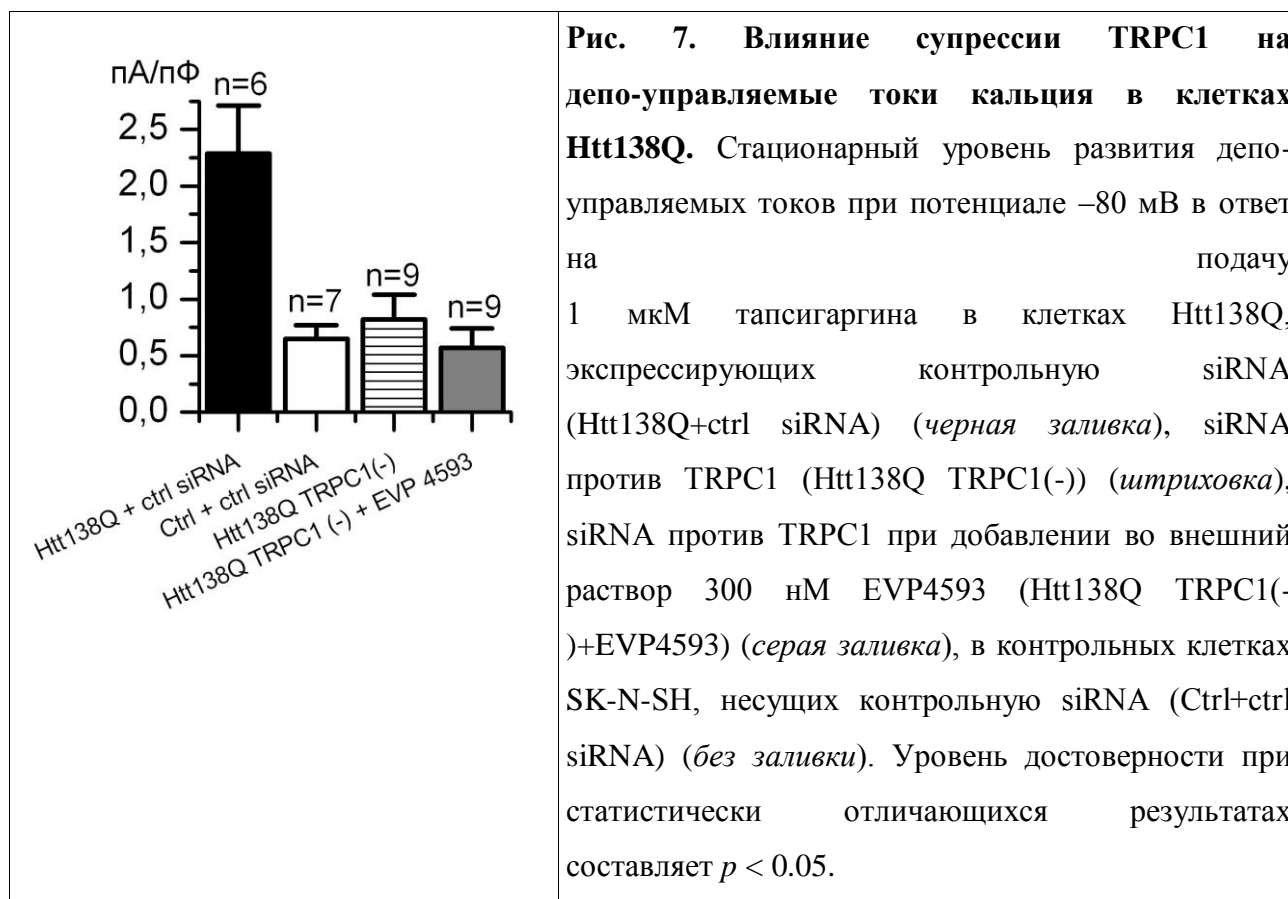


Рис. 6. Иммуноблот, показывающий уровень экспрессии белка TRPC1 в контрольных клетках SK-N-SH (Control); в клетках Htt138Q и в клетках Htt138Q, экспрессирующих плазмиду, несущую siRNA против TRPC1 (Htt138Q siRNA TRPC1).

Амплитуда тапсигаргин-индуцированных токов в клетках Htt138Q с подавленной экспрессией TRPC1 (Htt138Q TRPC1(-)) при потенциале -80 мВ составила примерно 0.8 пА/пФ и стала сравнима с амплитудой аналогичных токов в клетках SK-N-SH, несущих

контрольную siRNA, не имеющую специфичную мишень (Ctrl+ctrl siRNA) (рис. 7). В сравнении с токами, которые развиваются в клетках Htt138Q, трансфицированных контрольной siRNA (Htt138Q+ctrl siRNA), амплитуда токов в клетках Htt138Q TRPC1(-) снизилась примерно на 65%. (рис. 7). Это позволяет сделать вывод, что каналы, имеющие в своем составе субъединицу TRPC1, опосредуют аномальный депо-управляемый ответ в клетках Htt138Q (Вигонт и др., 2012).



EVP4593 также действовал на депо-управляемые токи в клетках Htt138Q TRPC1(-) (рис. 7), но степень ингибирования токов была значительно меньше, чем в клетках Htt138Q без супрессии TRPC1 (рис. 4в). Полученные данные позволяют говорить о том, что EVP4593 способен блокировать каналы, содержащие белок TRPC1 в качестве субъединицы, а также высказать предположение, что TRPC1 служит непосредственной молекулярной мишенью для EVP4593.

(5) EVP4593 не оказывает влияние на депо-управляемый вход кальция в клетках SK-N-SH с оверэкспрессией белка TRPC1

Для того чтобы подтвердить или опровергнуть гипотезу о том, что белок TRPC1 является непосредственной молекулярной мишенью для EVP4593, были взяты контрольные клетки SK-N-SH с оверэкспрессией TRPC1. Если соединение EVP4593 воздействует на белок TRPC1 напрямую, оно должно блокировать гомоолигомерные каналы (состоящие только из субъединиц TRPC1), образующиеся в условиях оверэкспрессии белка TRPC1. Эффективность оверэкспрессии TRPC1 в клетках SK-N-SH была подтверждена с помощью иммуноблота (рис. 8).

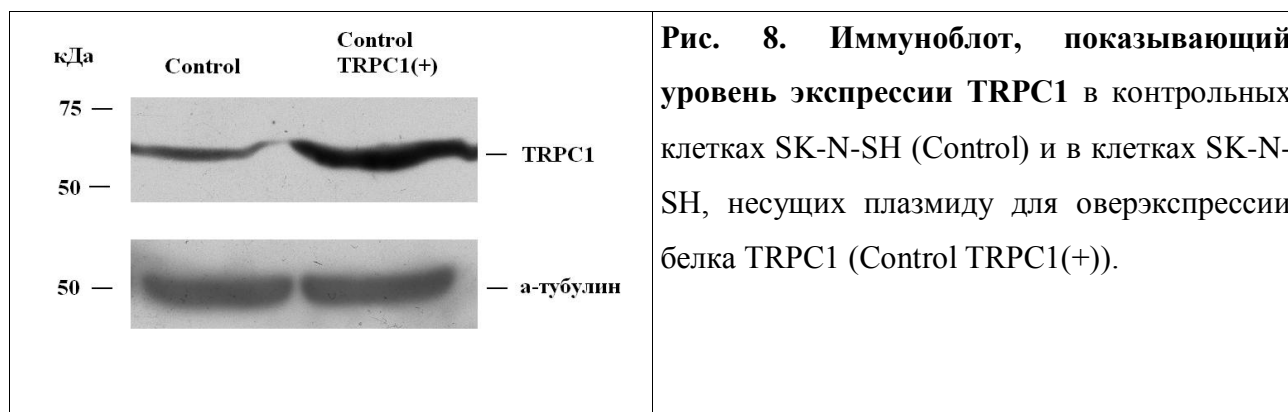
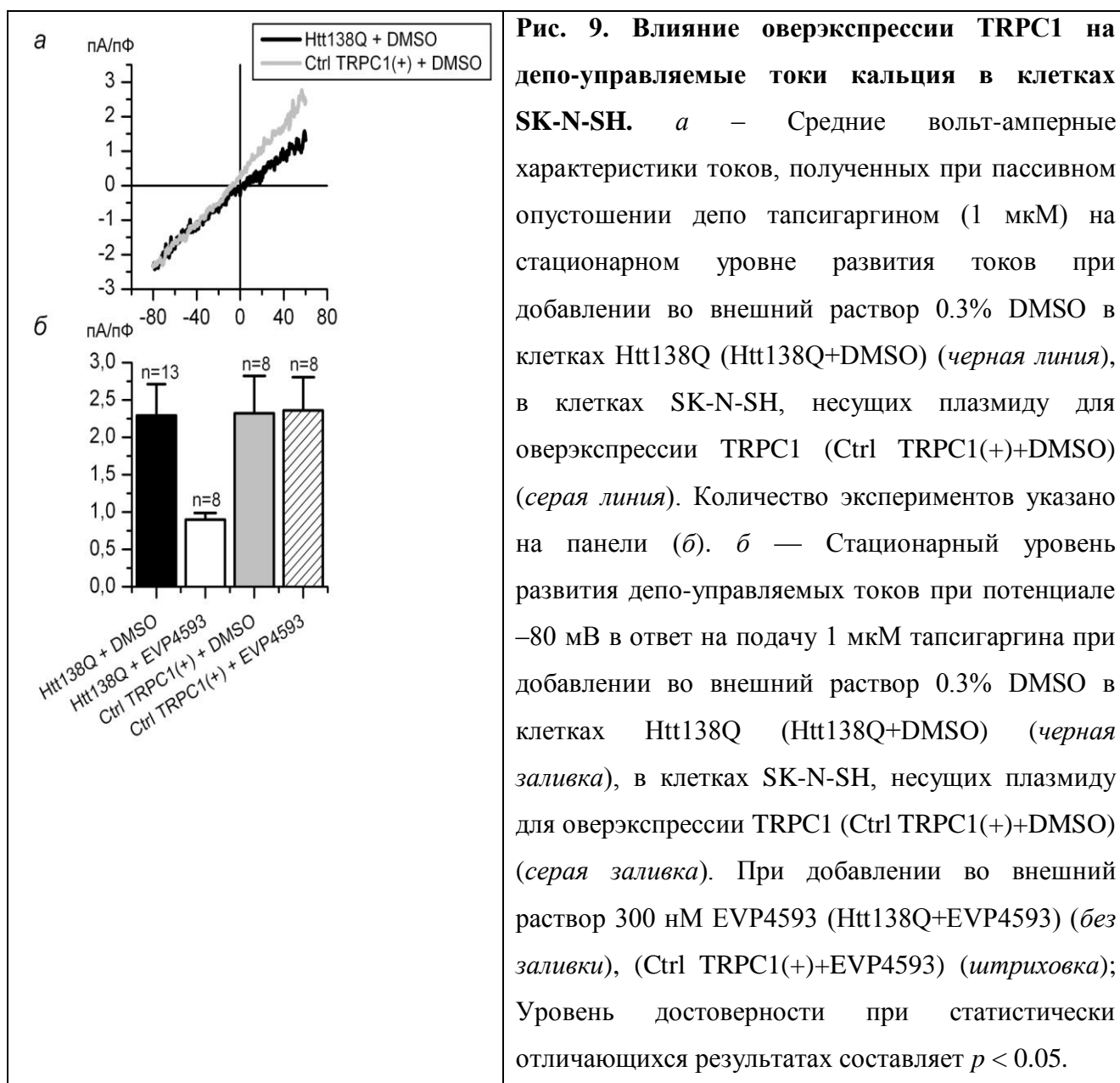


Рис. 8. Иммуноблот, показывающий уровень экспрессии TRPC1 в контрольных клетках SK-N-SH (Control) и в клетках SK-N-SH, несущих плазмиду для оверэкспрессии белка TRPC1 (Control TRPC1(+)).

Депо-управляемые токи в клетках Ctrl TRPC1(+), индуцированные тапсигаргином, имели практически такую же амплитуду при потенциале -80 мВ (2.3 пА/пФ), как и токи в клетках Htt138Q (рис. 9а,б). Однако детальное сравнение этих токов показало значительное расхождение в вольт-амперных характеристиках, особенно заметное в области положительных потенциалов (рис. 9а). Напомним, что иммуноблот с антителами против TRPC1 также продемонстрировал, что в клетках Htt138Q уровень экспрессии TRPC1 не выше, чем в интактных клетках SK-N-SH (рис. 6).

Эксперименты показали, что депо-управляемые токи в клетках Ctrl TRPC1(+) не блокируются EVP4593 в концентрации 300 нМ (рис. 9б). Установлено, что увеличение концентрации EVP4593 в 10 и в 100 раз не влияло на тапсигаргин-индуцированные токи в клетках Ctrl TRPC1(+) (данные не представлены).

Из представленных результатов следует, что EVP4593 способен подавлять активность каналов, включающих TRPC1 как одну из субъединиц, но не гомоолигомерных каналов, состоящих исключительно из TRPC1. Таким образом, несмотря на то, что аномальный депо-управляемый ответ в клетках Htt138Q опосредуется каналами, содержащими TRPC1, сам белок TRPC1 не служит непосредственной молекулярной мишенью для EVP4593.



(6) Для активации депо-управляемого входа кальция в клетках Htt138Q требуется присутствие белка STIM1

Следующей задачей нашей работы стало исследование роли белка STIM1, являющегося кальциевым сенсором в люменальном пространстве ЭР (Dziadek et al., 2007), в активации депо-управляемого входа в клетках SK-N-SH Htt138Q. Для удобства исследования белок хантингтин со 138 остатками глутамина был заменен на его же N-концевой фрагмент, содержащий точно такой же длины полиглутаминовый тракт, а доставка экспрессионной конструкции стала осуществляться не с помощью трансфекции, а посредством заражения клеток лентивирусом, несущим нужную плазмиду.

Экспрессия STIM1 в клетках Htt138Q была подавлена с помощью siRNA. Эффективность супрессии была подтверждена с помощью иммуноблота (рис. 10).

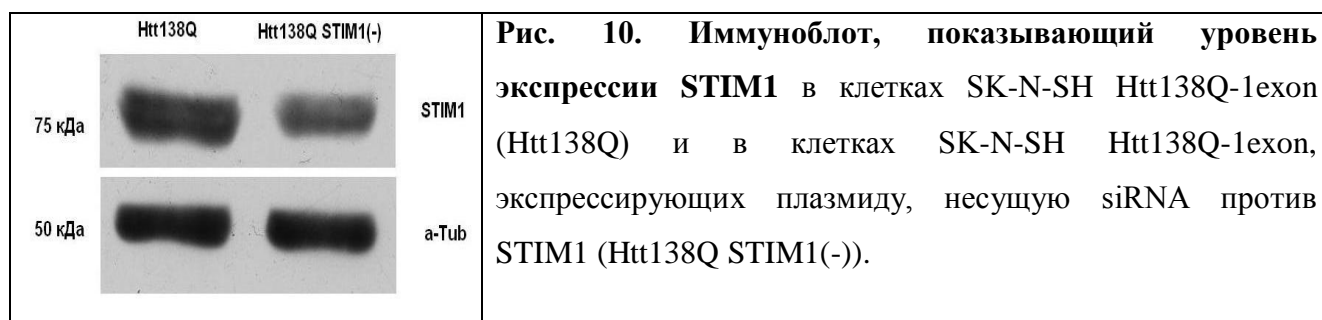
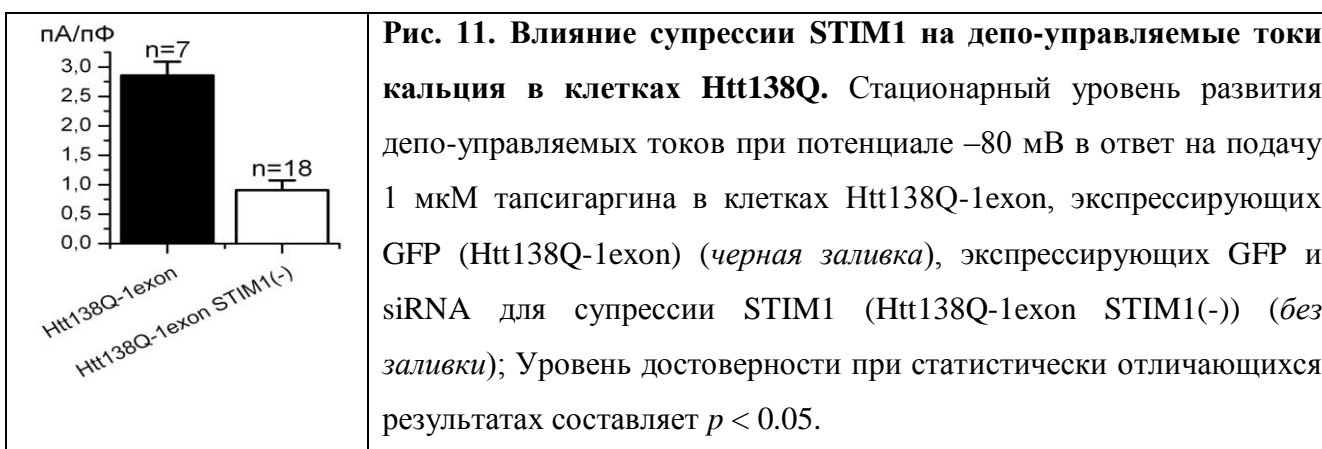
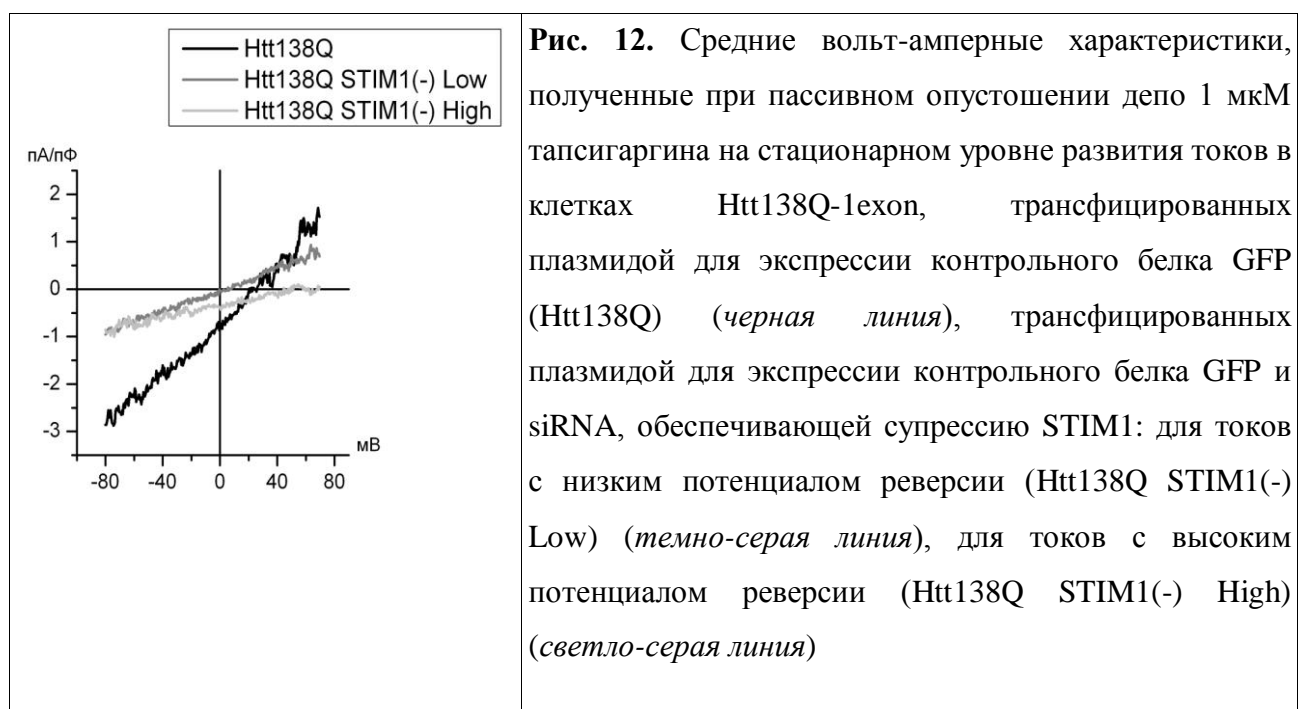


Рис. 10. Иммуноблот, показывающий уровень экспрессии STIM1 в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon (Htt138Q) и в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon, экспрессирующих плазмиду, несущую siRNA против STIM1 (Htt138Q STIM1(-)).

Электрофизиологические эксперименты показали, что супрессия STIM1 приводит к выраженному уменьшению амплитуды (примерно на 60%) тапсигаргин-индуцированных токов в клетках Htt138Q-1exon (рис. 11). Таким образом, можно сделать вывод, что белок STIM1 является важным звеном в активации депо-управляемого ответа в клетках Htt138Q.



Более детальное рассмотрение депо-управляемых токов в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-) показало, что эти токи можно условно разделить на два пула, различаемых по селективности (рис. 12). Полученные данные позволяют говорить о том, что в клетках Htt138Q за депо-управляемый вход кальция отвечают, по меньшей мере, два различных типа каналов.



Заключение

Полученные результаты демонстрируют, что экспрессия мутантного хантингтина Htt138Q (или N-концевого фрагмента мутантного хантингтина) как в клетках нейробластомы человека (SK-N-SH), так и в первичной культуре нейронов стриатума мыши (MSN), приводит к аномально большому депо-управляемому входу кальция в цитозоль.

Результаты, демонстрирующие, что соединение EVP4593 способно снижать до контрольных значений аномально большой депо-управляемый вход кальция как в SK-N-SH, так и в MSN, позволяют надеяться на создание на основе этого соединения лекарственного средства для терапии пациентов с БХ.

Выводы

1. В клетках нейробластомы человека SK-N-SH, экспрессирующих мутантную форму белка хантингтина (Htt138Q), депо-управляемый вход кальция повышен в 5 раз по сравнению с контролем.
2. В клетках первичной культуры нейронов стриатума мыши MSN, экспрессирующих N-концевой фрагмент мутантного белка хантингтина (Htt138Q-1exon), депо-управляемый вход кальция увеличен в 2 раза по сравнению с контролем.
3. Соединение EVP4593 способно осуществлять обратимый блок аномально большого депо-управляемого входа кальция в клетках SK-N-SH, экспрессирующих Htt138Q.
4. Соединение EVP4593 способно блокировать аномально большой депо-управляемый вход кальция в клетках MSN, экспрессирующих Htt138Q-1exon.
5. В клетках SK-N-SH, экспрессирующих Htt138Q, депо-управляемый вход требует присутствия сенсора кальция в ЭР, белка STIM1, и опосредуется, в основном, каналами, содержащими белок TRPC1, как субъединицу канала.

Список публикаций по теме диссертации

1. Глушанкова Л.Н., Зими́на О.А., **Вигонт В.А.**, Можаяева Г.Н., Безпрозванный И.Б., Казначеева Е.В. «Изменение депо-управляемого входа кальция в клеточной модели болезни Хантингтона». // Доклады Академии Наук. 2010. Т. 433. № 6. С. 1–4.
2. Jun Wu*, Hsin-Pei Shih*, **Vladimir Vigont***, Lori Hrdlicka, Len Diggins, Carol Singh, Matt Mahoney, Richard Chesworth, Gideon Shapiro, Michael Ahljanian, Gerhard Koenig, Olga Zimina, Lyubov Glushankova, Elena Kaznachejeva, Ilya Bezprozvanny. «Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment». // Chemistry and Biology. 2011. V.18. №6. P. 777–793. * **Равный вклад.**
3. **Вигонт В.А.**, Зими́на О.А., Глушанкова Л.Н., Безпрозванный И.Б., Можаяева Г.Н., Казначеева Е.В. «Депо-зависимый вход кальция в клетки нейробластомы человека SK-N-SH, моделирующие болезнь Хантингтона». // Биологические мембраны. 2012. Т. 29. № 12. С. 1–10.

Список цитируемой литературы

- 1. Болдырев А.А.,** Кяйвярайнен Е.И., Илюха В.А. // Биомембранология. Петрозаводск: Кар НЦ РАН, 2006. С. 226.
- 2. Ткачук В.А.** // Соросовский образовательный журнал. 2001. Т. 7. №. 1. С. 10–15.
- 3. Ambudkar I.S., Ong H.L., Liu X. et al.** // Cell Calcium. 2007. V.42. №2. P. 213–223.
- 4. Berna-Erro A., Braun A., Kraft R. et al.** // Sci. Signal. 2009. V.2. №93. ra67.
- 5. Bossy-Wetzell E., Petrilli A., Knott A.B.** // Trends Neurosci. 2008. V.31. №12. P. 609–616.
- 6. Bouron A., Altafaj X., Boisseau S. et al.,** // Brain Res. Dev. Brain Res. 2005. V. 159 №1. P. 64–71.
- 7. Cafaroli E., Brini M.** // Curr. Opin. Chem. Biol. 2000. V. 4. P. 152–161.
- 8. Clapham D.E.** // Gen. Physiol. 2002. V. 120. P. 217–220.
- 9. Dziadek M.A., Johnstone L.S.** // Cell Calcium. 2007. V.42. №2. P. 123–132.
- 10. Graham S., Yuan J.P., Ma R.** // Exp. Biol Med. 2012. V.237. №2. P. 111–118.
- 11. Gruszczynska-Biegala J., Pomorski P., Wisniewska M.B. et al.,** // PLOS One. 2011. V.6. №4. e19285.
- 12. Hamill O.P., Sakmann B.** // Nature. 1981. V.294. №5840. P. 462–464.
- 13. Hasan G., Venkiteswaran G.** // Front. Neural. Circuits. 2010. V.4. P. 10.
- 14. Kaltenbach L.S., Romero E., Becklin R.R. et al.,** // PLOS Genet. 2007. V.3. №5. e82.
- 15. Khoshnan A., Ko J., Watkin E.E. et al.** // J. Neurosci. 2004. V.24. №37. P. 7999–8008.
- 16. Manjarrés I.M., Rodríguez-García A., Alonso M.T., García-Sancho J.** // Cell Calcium. 2010. V.47.№5. P. 412–428.
- 17. Nakai M., Qin Z.H., Chen J.F., Wang Y., Chase T.N.** // J. Neurochem. 2000. V.74. №2. P. 647–658.
- 18. Narayanan K.L., Irmady K., Subramaniam S., Unsicker K., von Bohlen und Halbach O.** 2008. // Neurosci. Lett. 2008. V.446. №2-3 P. 117–122.
- 19. Okamura H., Rao A.** // Curr. Opin. Cell Biol. 2001. V.13. №2. P. 239–243.
- 20. Panov A.V., Gutekunst C.A., Leavitt B.R. et al.** // Nat. Neurosci. 2002. V.5. №8. 731–736.
- 21. Parekh A.B., Putney J.W.** // Physiol. Rev. 2005. V.85. P. 757–810.
- 22. Peinelt C., Vig M., Koomoa D.L. et al.** // Nat.Cell Biol. 2006. V.8. №7. P. 771–773.
- 23. Pieri M., Caioli S., Canu N.** // Exp. Neurol. pii: S0014-4886(12)00419-0.
- 24. Poggioli J., Putney J.W.** // Pflugers Arch. 1982. V.392. №3. P. 239–243.
- 25. Qin. Z.H., Wang Y., Nakai M., Chase T.N.** // Mol. Pharmacol. 1998. V.53. №1. P. 33–42.
- 26. Riccio A., Medhurst A.D., Mattei C. et al.** // Brain Res. Mol. Brain Res. 2002. V.109. №1-2. P. 95–104.
- 27. Salido .M., Sage S.O., Rosado J.A.** // Biochem. Biophys. Acta. 2009. V.1793. №2. P. 223–230.
- 28. Selvaraj S., Sun Y., Singh B.B.** // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 2010. V.9. №1. P. 94–104.
- 29. Stankunas K., Graef I.A., Neilson J.R., Park S.H., Crabtree G.R.** // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.1999. V.64. P. 505–516.
- 30. Tang T-Sh., Tu H., Chan Edmond Y.W. et al.** // Neuron. 2003. V.39. №2. P. 227–239.
- 31. Tobe M., Isobe Y., Tomizawa H., et al.** // Bioorg. Med. Chem. 2003. V.11. №3. P. 383–391.
- 32. Vonsattel J.P., Myers R.H., Stevens T.J. et al.** // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1985. V.44. №6. P. 559–577.
- 33. Vosler P.S., Brennan C.S., Chen J.** // Mol Neurobiol. 2008. V.38. №1. P. 78–100.
- 34. Wang Y., Deng X., Zhou Y. et al.** // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2009. V.106. № 18. P. 7391–7396.
- 35. Wu**

X., Babnigg G., Villereal M.L. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2000. V.278. №3. P. 526–536. **36.**
Yamamoto S., Wajima T., Hara Y., Nishida M., Mori Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V.1772.
№8. P. 958–967. **37.** **Yuan J.P.**, Zeng W., Worley P.F., Muallem S. // *Nature Cell Biology.* .2007.
V.9. №6. P. 636–645. **38.** **Zeron M.M.**, Hansson O., Chen N. et al. // *Neuron.* 2002. V.33. №6.
P. 849–860.