

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого»
Институт физики, нанотехнологий и телекоммуникаций
Кафедра «Биофизика»

Работа допущена к защите

Зав. кафедрой, проф.

_____ Скворцов А.Н.

"__" _____ 2017 г.

ВЫПУСКНАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

по теме:

**ВЛИЯНИЕ ЭКСПРЕССИИ НАР1А НА ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД
КАЛЬЦИЯ В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА**

Направление: 03.03.02 – Физика

Профиль: 03.03.02_02 – Биохимическая физика

Выполнил студент гр. 43417/1

В.А. Боева

(подпись)

Руководители, к.б.н.

В.А. Вигонт

(подпись)

д.б.н., проф.

А.Н. Скворцов

(подпись)

Рецензент, д.ф.-м.н., проф.

Ю.Н. Орлов

(подпись)

Санкт-Петербург 2017

Реферат

с.35, рис. 3, 37 источников.

ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ, КАЛЬЦИЙ, БОЛЕЗНЬ ХАНТИНГТОНА, МЕТОД ЛОКАЛЬНОЙ ФИКСАЦИИ ПОТЕНЦИАЛА, HAP1A

В работе исследовано влияние экспрессии белка HAP1A (Huntingtin-associated protein 1 A) на депо-управляемый вход кальция в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, моделирующих болезнь Хантингтона путем экспрессии полноразмерного мутантного хантингтина со 138 остатками глутамина. Установлено, что экспрессия HAP1A ведет к снижению тапсигаргин-индуцированных токов и появлению конститутивно активных депо-управляемых каналов в клетках SK-N-SH, моделирующих болезнь Хантингтона. Также продемонстрировано, что экспрессия HAP1A не ведет к изменению экспрессионного профиля белков, отвечающих за депо-управляемый вход в исследуемых клетках, а именно белка-сенсора кальция в эндоплазматическом ретикулуме STIM1 и каналобразующих белков TRPC1 и Orai1.

Summary

p.35, fig.3, 37 ref.

STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY, CALCIUM, HUNTINGTON'S DISEASE, PATCH CLAMP TECHNIQUE, HAP1A

Here we investigated the effect of HAP1A (Huntingtin-associated protein 1 A) expression on store-operated calcium entry in human neuroblastoma SK-N-SH cells modeling Huntington's disease by expression of the full-length mutant huntingtin with 138 glutamine residues. It has been shown that the expression of HAP1A results in reduction of thapsigargin-induced currents and in appearance of constitutively active store-operated channels in SK-N-SH modeling Huntington's disease. Further we demonstrated that the expression of HAP1A does not affect the expression levels of proteins maintaining store-operated calcium entry in these cells, specifically the calcium sensor in the endoplasmic reticulum STIM1 protein and the pore-forming proteins TRPC1 and Orai1.

Оглавление

Список сокращений	6
Введение	7
Литературный обзор	10
1.1. Кальциевая сигнализация.....	10
1.2. Депо-управляемый вход кальция	11
1.3. Болезнь Хантингтона.....	13
1.4. Нарушение кальциевой сигнализации при болезни Хантингтона	14
1.5. Белок NAR1A	15
Материалы и методы.....	17
2.1. Клетки	17
2.2. Транфекция	17
2.3. Электрофизиологические измерения	18
2.4. Приготовление лизатов для электрофореза	19
2.5. Электрофорез и иммуноблоттинг	20
Результаты и обсуждение	21
3.1. В клетках SK-N-SH, моделирующих болезнь Хантингтона и экспрессирующих NAR1A, уменьшен тапсигаргин-индуцированный вход кальция.....	21
3.2. Экспрессия NAR1A не влияет на экспрессию белков STIM1, TRPC1 и Orai1, участвующих в поддержании депо-управляемого входа кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q	24
3.3. Экспрессия NAR1A ведет к появлению конститутивной активности депо-управляемых кальциевых каналов	26
Выводы	31

Список литературы 32

Список сокращений

CRAC-каналы – кальциевые каналы, активируемые высвобождением кальция (Calcium release-activated calcium-каналы)

HAР1А– хантингтин-ассоциированный белок 1А (huntingtin-associated protein 1 А)

Htt – хантингтин (белок)

IP₃ – инозитол(1,4,5)трисфосфат

IP₃R – рецептор инозитол(1,4,5)трисфосфата

mHTT–мутантный белок хантингтин

RyR – рианодиновый рецептор

SERCA– кальциевая АТФаза сарко/эндоплазматического ретикулума (Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ -АТPase)

SK-N-SH Htt138Q – клетки нейробластомы человека, в которых проэкспрессировали полноразмерный белок хантингтин, содержащий 138 глутаминовых остатков

SK-N-SH Htt138Q HAР1А – клетки нейробластомы человека, в которых проэкспрессировали полноразмерный белок хантингтин, содержащий 138 остатков глутамина, и белок HAР1А.

STIM – Stromal Interaction Molecule (белок)

TRPC – Transient Receptor Potential Canonical (подсемейство белков)

БХ – болезнь Хантингтона

ПМ – Плазматическая Мембрана

ЭР – Эндоплазматический Ретикулум

Введение

Болезнь Хантингтона – аутосомно-доминантная нейродегенеративная патология, связанная с мутацией в гене, кодирующем белок хантингтин (Htt), который выполняет адаптерную функцию, определяя колокализацию взаимодействующих с ним белков и помогая им выполнять свои функции. Заболевание вызвано увеличением количества глутамин-кодирующих кодонов в первом экзоне гена, кодирующего данный белок. Наиболее сильно подвержены дегенерации нейроны стриатума, функцией которого является, в частности, регуляция мышечного тонуса. Следствием этого является развитие такого симптома, как дрожательный паралич конечностей [1]. Одним из токсических эффектов мутантного Htt является нарушение кальциевой сигнализации в клетке, в частности, патологическое изменение уровня депо-управляемого входа кальция [2].

Важным путем передачи сигнала от плазматической мембраны к органеллам внутри клетки является кальциевая сигнализация. В состоянии покоя концентрация ионов кальция в цитозоле не превышает 10^{-7} М, но в случае стимуляции может увеличиваться на один-два порядка. Увеличение концентрации кальция в цитозоле происходит за счет выброса кальция из внутриклеточных депо и входа кальция из внеклеточной среды через каналы плазматической мембраны (ПМ). Одним из наиболее распространенных механизмов притока кальция является вход кальция через депо-управляемые каналы, активирующиеся в ответ на понижение концентрации кальция в депо, роль которых в разных клетках выполняют, в основном, эндоплазматический (ЭР) и саркоплазматический ретикулумы. Основная теория передачи сигнала от ЭР к ПМ – теория конформационного сопряжения, которая подразумевает непосредственное взаимодействие между белками ЭР и белками ПМ. Здесь к белкам ЭР, прежде всего, относятся STIM1 и STIM2, кальциевые сенсоры ЭР, играющие ключевую роль в активации депо-управляемого входа, и IP₃R1, который отвечает за выброс кальция из депо, а к белкам ПМ представители

таких белковых семейств, как TRPC и Orai, формирующие ионные поры каналов [3].

Известно, что мутантный Htt, связываясь с С-концом IP₃R1 (рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата 1), увеличивает его аффинность к своему лиганду, что может приводить к опустошению кальциевых депо ЭР уже при базальном уровне IP₃ (инозитол-1,4,5-трифосфата). В результате этого возможно увеличение депо-управляемого входа кальция в клетку [4].

Для белка HAP1 (Huntingtin-associated protein 1) было показано, что он связывается с хантингтином, причем, чем больше длина полиглутаминового тракта, тем прочнее связь [5]. HAP1 имеет несколько важных функций: он вовлечен в везикулярный транспорт через его взаимодействие с микротрубочковыми транспортерами и везикулами, вовлечен в эндосомальный оборот и сигнализацию EGFR (рецептор эпидермального фактора роста). IP₃R1-HAP1A-mHTT образуют троичный белковый комплекс [4]. У грызунов было выделено две изоформы белка HAP1A и HAP1B, имеющие различия на С-концах. Только одна изоформа HAP1 была обнаружена у человека, и она наиболее схожа с HAP1A.

Цель работы – определение влияния экспрессии HAP1A на уровень депо-управляемого кальциевого входа в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, экспрессирующих мутантный хантингтин со 138 глутаминовыми остатками (SK-N-SH Htt138Q) и моделирующих болезнь Хантингтона. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать тапсигаргин-индуцированный депо-управляемый вход кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q, экспрессирующих белок HAP1A (SK-N-SH Htt138Q HAP1A).

2. Исследовать влияние экспрессии HAP1A на экспрессионный профиль белков, поддерживающих депо-управляемый вход кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q, а именно, белков STIM1, TRPC1 и Orai1.

3. Исследовать ингибирование депо-управляемых кальциевых токов ионами гадолиния в клетках SK-N-SH Htt138Q GFP и SK-N-SH Htt138Q NAR1A.

Работа выполнена в лаборатории ионных каналов клеточных мембран (ИККМ) на базе Института цитологии Российской Академии Наук (ИНЦ РАН).

Литературный обзор

1.1. Кальциевая сигнализация

За счет изменения концентрации кальция в клетках происходит регуляция множества клеточных процессов, среди которых мышечное сокращение, выброс нейромедиаторов из нервных окончаний, пролиферация и дифференциация клеток, транскрипция ДНК, апоптоз.

В состоянии покоя концентрация ионов кальция в цитозоле очень низка и не превышает 10^{-7} М [6]. Стимуляция клетки, к примеру, деполяризацией мембраны, может привести к повышению концентрации кальция в цитозоле на один-два порядка. Подобное повышение может происходить за счет входа кальция из внеклеточной среды через каналы плазматической мембраны (ПМ) и выброса кальция из так называемых внутриклеточных депо, в которых содержится основной запас кальция клетки и роль которых в различных типах клеток выполняют в большинстве случаев эндоплазматический (ЭР) и саркоплазматический ретикулумы [6]. Также, поддержание высокой концентрации кальция в депо достигается за счет кальций-связывающих белков в люмене ЭР, в частности, таких как кальсеквестрин и кальретикулин, и белков, содержащих кальций-связывающий домен EF-hand, к которым относятся кальциевые сенсоры STIM1 и STIM2 (Stromal interaction molecule 1, 2) [7,8].

Существуют и иные механизмы поддержания кальциевого гомеостаза, например, захват кальция митохондриями. И хотя эта система не обладает высокой аффинностью, из-за своей достаточно большой емкости митохондрии играют важную роль в кальциевой сигнализации [9].

Приток ионов кальция из внеклеточного пространства в цитозоль происходит через каналы ПМ. Ионные кальциевые каналы классифицируются по способу управления их состоянием: потенциал-управляемые (характерные для электровозбудимых клеток [10]), лиганд-управляемые (активируемые при связывании рецепторов на ПМ) и депо-управляемые кальциевые каналы

(активируемые при понижении концентрации кальция в депо). Механизм работы депо-управляемых кальциевых каналов будет рассмотрен более подробно ниже.

1.2. Депо-управляемый вход кальция

Одним из наиболее распространенных механизмов притока кальция является вход кальция через депо-управляемые каналы. Наличие этого механизма показано и для электронеовозбудимых клеток [11], и для нейронов [12]. Активация депо-управляемых кальциевых каналов происходит вследствие снижения концентрации ионов кальция в депо.

Рецепторы на поверхности ПМ, связываясь со своими лигандами, запускают каскад, который передает сигнал от ПМ клетки к ее органеллам. Так, передача сигнала может осуществляться с помощью вторичных мессенджеров, например, инозитол(1,4,5)трисфосфата (IP_3). При связывании рецепторов ПМ со своими лигандами, может активироваться одна из изоформ фосфолипазы C, которая гидролизует мембранный фосфолипид фосфатидилинозитол(4,5)бисфосфат, расщепляя его на диацилглицерол, так же являющимся вторичным мессенджером, и IP_3 . Затем IP_3 диффундирует к поверхности ЭР, где находятся рецепторы IP_3 (IP_3R). IP_3R являются кальций-проницаемыми каналами, открывающимися при связывании со своим лигандом и осуществляющими выброс кальция из депо в цитозоль [13].

Выход кальция из внутриклеточного депо может происходить через рианодиновые рецепторы (RyR), которые так же являются лиганд-управляемыми кальций-проницаемыми каналами. Для физиологических процессов активатором RyR служит циклическая ADP-рибоза [14].

На понижение концентрации кальция в люмене ЭР реагируют белки STIM1 и STIM2, являющиеся кальциевыми сенсорами. Белки STIM1 и STIM2 высокомолекулярны, однако, белок STIM1 более высокоаффинный к ионам кальция, чем STIM2. Следовательно, STIM1 реагирует на значительные

изменения концентрации кальция в люмене ЭР, а STIM2 способен реагировать на малые флуктуации концентрации. При заполненном депо белок STIM1 находится в неолигомеризованном состоянии. При опустошении депо белок меняет свою конформацию, происходит его олигомеризация, и STIM1 транспортируется в область, прилежащую к ПМ, где он взаимодействует с белковыми комплексами ПМ и активирует депо-управляемый вход кальция [7,8].

Депо-управляемые кальциевые каналы ПМ представлены в клетках белками семейства Orai и подсемейства TRPC (transient receptor potential canonical).

CRAC-каналы (Calcium release-activated calcium) являются депо-управляемыми низкопроводящими кальциевыми каналами, обладающими высокой селективностью [15]. Исследования показали, что CRAC-канал является гексамером, состоящим из 6 единиц Orai1 весом в 36 кДа [16].

Каналы TRPC представляют собой тетрамеры (гомо- и гетеро-) из субъединиц с шестью трансмембранными доменами. Образованные каналы обладают сравнительно меньшей селективностью по отношению к ионам кальция. Подсемейство TRPC включает в себя 7 белков (TRPC1-7), и для белка TRPC1 массой порядка 90 кДа наилучшим образом было показано его участие в депо-управляемом входе кальция [17].

Депо-управляемый кальциевый вход может быть активирован любым процессом, опустошающим депо. Для экспериментального исследования депо-управляемых каналов в лабораторных условиях применяются следующие методы: 1) аппликация иономицина для увеличения ионной проницаемости мембраны ЭР; 2) использование хелаторов EGTA или BAPTA в высокой концентрации, которые связывают кальций, выходящий из депо через канал утечки и предотвращают перезаполнение этим кальцием депо; 3) использование ингибиторов АТФазы SERCA, закачивающей кальций из

цитозоля в депо, среди них тапсигаргин, циклопиазоновая кислота, ди-трет-бутилгидрохинон. В этом случае ингибитор необратимо связывается с АТФазой, вызывая пассивный выход кальция в цитозоль; 4) увеличение чувствительности рецепторов IP_3 к базальному уровню IP_3 с помощью тимеросала; 5) загрузка непосредственно в депо мембранопроницаемого хелатора кальция ТРЕН (тетраakis-(2-пиридилметил)-этилендиамин), который не изменяет общую концентрацию ионов кальция, но снижает концентрацию свободных ионов внутрилюменального кальция, что ведет к созданию сигнала об опустошении депо.

1.3. Болезнь Хантингтона

Болезнь Хантингтона (хорея Хантингтона) – нейродегенеративное аутосомно-доминантное заболевание, вызванное увеличением СAG-повторов в первом экзоне гена $IP15$, кодирующего белок хантингтин. Данный белок имеет вес 350 кДа и является адаптерным белком, т.е. обеспечивает колокализацию взаимодействующих с ним белков. При этом, функции этих белков самые разнообразные: они вовлечены в везикулярный транспорт, регуляцию транскрипции, апоптоз и др. [18]. Внутриклеточно, Htt локализован как в цитозоле, так и в ядре, показана ассоциация с микротрубочками, митохондриями и различными везикулярными структурами [19].

Хантингтин экспрессируется во всех типах клеток человека, но его концентрация особенно высока в нейронах. Мутантный белок экспрессируется во всем теле, но селективная дегенерация наблюдается в первую очередь в срединных шипиковых нейронах стриатума [1], функцией которого, в частности, является регуляция (уменьшение) мышечного тонуса. В норме длина полиглутаминового тракта в хантингтине не превышает 35 остатков, тогда как при патологии может достигать 90 и более. При этом, чем больше количество остатков глутамина, тем раньше возраст манифестации. В среднем, первые симптомы проявляются в 30-50 лет. Основными симптомами болезни Хантингтона являются прогрессирующий хореический гиперкинез, спазмы

лицевой мускулатуры, нарушение артикуляции, нарушение мышления, внимания, исполнительных функций, депрессия, апатия, раздражительность, возможны бред и навязчивые состояния.

Основной теорией токсического эффекта мутантного хантингтина является образование нерастворимых белковых агрегатов (телец включения) в нейронах центральной нервной системы [20]. Эти нейрональные клеточные образования достигают 5-7 мкм и помимо мутантного Htt могут содержать и другие белки.

Тем не менее, вопрос о молекулярных механизмах возникновения БХ до сих пор остается открытым. Одной из теорий развития патологии является кальциевая теория БХ.

1.4. Нарушение кальциевой сигнализации при болезни Хантингтона

Ранее было показано, что мутация в гене, кодирующем Htt, может привести к нарушению регуляции транскрипции [21], дефектам внутриклеточного транспорта [22], митохондриальной дисфункции [23], синаптической дисфункции и эксайтотоксичности [24] и нарушению кальциевой сигнализации [25,26].

Так, мутантный Htt влияет на экспрессию кальций-связывающих белков [27]. От уровня экспрессии кальций-связывающих белков зависит способность клетки к забуфериванию кальция в цитозоле. Уже в 1985 году была показана связь между уровнем экспрессии кальций-связывающих белков и выживаемостью интернейронов при БХ [28]. Снижение количества кальций-связывающих белков ведет к повышению внутриклеточной концентрации кальция.

Еще одним токсическим действием мутантного Htt является глутаматопосредованная эксайтотоксичность, которая приводит к значительному притоку кальция через ПМ в цитозоль [29]. Увеличение токов через NMDA-рецептор является следствием действия мутантного Htt на транспорт NMDA-

рецептора к плазматической мембране [30]. Также было показано, что мутантный Htt влияет на потенциал-зависимые кальциевые каналы [31].

Мутантный Htt (в отличие от Htt дикого типа) непосредственно взаимодействует с С-концом IP_3R первого типа (IP_3R1), повышая аффинность рецептора к своему лиганду, что может приводить к опустошению кальциевых депо уже при базальном уровне IP_3 в цитозоле, вследствие чего происходит отток ионов кальция из люмена ЭР [4]. Депонирование кальция в клетках, в которых был проэкспрессирован мутантный Htt, нарушено.

Все вышеперечисленные механизмы ведут к повышению концентрации кальция в цитозоле, что приводит к перегрузке кальцием митохондрий, активации митохондриальной поры, высвобождению в цитозоль цитохрома С и каспаз и, в результате, к апоптической гибели клетки [32].

В нашей лаборатории было показано, что в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, в которых был проэкспрессирован полноразмерный мутантный белок хантингтин с 138 глутаминовыми повторами, наблюдается аномальная активация депо-управляемых кальциевых каналов и уровень депо-управляемого входа кальция значительно увеличен по сравнению с контролем [33].

1.5. Белок HAP1A

Для белка HAP1 (Huntingtin-associated protein 1) было впервые показано, что он связывается с хантингтином, причем, чем больше длина полиглутаминового тракта, тем прочнее связь [5]. HAP1 имеет несколько важных функций: он вовлечен в везикулярный транспорт через его взаимодействие с микротрубочковыми транспортерами и везикулами, вовлечен в эндосомальный оборот и сигнализацию EGFR (рецептор эпидермального фактора роста). Также с помощью направленного разрушения HAP1 было показано, что HAP1 играет важную роль в функциональной активности гипоталамуса, хотя до сих пор остается неизвестным конкретная роль HAP1 в

патогенезе болезни Хантингтона, локус которой находится в стриатуме. IP_3R1 -НАР1А-мНТТ образуют троичный белковый комплекс [34]. У грызунов было выделено две изоформы белка НАР1А и НАР1В, имеющие различия на С-концах. Оба белка связываются с Нtt. Только одна изоформа НАР1 была обнаружена у человека, и она наиболее схожа с НАР1А, и обладает теми же функциональными эффектами при связи с хантингтином, мутантным хантингтином и IP_3R1 [5]. Известно, что экспрессия мутантного Нtt приводит к увеличению аффинности IP_3R1 к своему лиганду и увеличению депо-управляемого кальциевого входа. Также показано, что образование троичного комплекса IP_3R1 -НАР1А-мНТТ приводит к увеличению аффинности IP_3R1 к IP_3 . Логично предположить, что оверэкспрессия НАР1А в клетках, уже экспрессирующих мутантный хантингтин, может вызывать еще большую утечку ионов кальция из внутриклеточных депо в ответ на базальные концентрации IP_3 в клетке, что очевидным образом должно затрагивать работу депо-управляемых каналов.

Поэтому целью данной работы стало исследование влияния экспрессии НАР1А на уровень депо-управляемого кальциевого входа в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, моделирующих болезнь Хантингтона.

Материалы и методы

2.1. Клетки

Клетки нейробластомы человека SK-N-SH из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) и антибиотика (80 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия)). За 2 дня до начала эксперимента клетки высевали на фрагменты покровных стекол (3 × 3 мм). Для лучшей адгезии клеток стекла покрывали 0.01% раствором полилизина (Sigma, США).

2.2. Трансфекция

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 был встроен по XbaI/EcoRI-сайтам в вектор с устойчивостью к неомицину. Плазмида, кодирующая мутантный хантингтин была любезно предоставлена Др. Безпрозванным (The University of Texas Southwestern Medical Center, США).

Для проведения экспериментов по изучению влияния белка HAP1A на депо-управляемый вход кальция в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, моделирующих болезнь Хантингтона, проводили контрансфекцию плазмиды, кодирующей Htt138Q, с плазмидой, кодирующей белок HAP1A слитый с фрагментом зеленого флуоресцентного белка (GFP). (соотношение Htt138Q:HAP1-GFP=3:1). Для проведения контрольных экспериментов использовали котрансфекцию плазмиды, кодирующей Htt138Q с плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP) (соотношение Htt138Q:GFP=3:1).

Плазмида NAR1-GFP была любезно предоставлена профессором Яцеком Кузницки, Международный Институт молекулярной и клеточной биологии(Варшава).

Для проведения трансфекции брали клетки, культивированные на чашке диаметром 30 мм до плотности 80%.

В первый эппендорф добавляли 100 мкл среды DMEM без сыворотки , 10 мкл трансфицирующего агента Унифектин-56 (ИБХ РАН, Москва), смесь тщательно перемешивали. Во второй эппендорф добавляли 100 мкл среды DMEM без сыворотки, 4 мкг плазмидной ДНК (соотношение Htt138Q:NAR1-GFP=3:1), тщательно перемешивали. Затем содержимое первого и второго эппендорфов смешивали и аккуратно пипетировали. Раствор оставляли на 15-20 минут при комнатной температуре, затем добавляли по каплям в чашки с клетками. Трансфекция проводилась за 24 часа до проведения электрофизиологических экспериментов.

2.3. Электрофизиологические измерения

Ионные токи записывались с использованием метода локальной фиксации потенциала в условиях регистрации тока от целой клетки. Измерения выполняли с помощью усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Сопротивление микроэлектродов составляло 5–10 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. Сопротивление доступа составляло не более 20 МОм и его изменение не превышало 20% в течение всего

эксперимента. Записанные токи нормировали относительно емкости клетки. Записи, полученные до активации исследуемых токов, использовали для вычитания тока утечки и тока через другие каналы.

Растворы

В измерениях тока от целой клетки раствор регистрирующей пипетки содержал (в мМ): 135 CsCl, 10 EGTA-Cs, 10 Hepes-Cs, 6.4 CaCl₂, 1.5 MgCl₂,

4 Na-АТР, (pCa7), рН 7.4. Внеклеточный раствор содержал (в мМ):

140 NMDG-Asp, 10 BaCl₂, 10 Hepes-Cs, 0.01 нифедипина, рН 7.3. Для активации депо-управляемых токов во внеклеточный раствор добавляли 1 мкМ тапсигаргина. Для последующего блокирования депо-управляемого входа кальция использовался раствор, содержащий 1 мкМ тапсигаргина и 1 мкМ хлорида гадолиния. Соединения подавали к объекту путем перфузии. Все используемые реагенты были получены в фирме Sigma, США.

2.4. Приготовление лизатов для электрофореза

Чашки с клетками через 24 часа после трансфекции помещали на 10 минут на +4°C. Затем клетки аккуратно промывали от среды фосфатно-солевым буфером. Не давая клеткам высохнуть, добавляли лизирующий буфер (100 мкл на чашку диаметром 30 мм) следующего состава: 20 мМ трис-НСl рН 7.5, 150 мМ NaCl, 1% тритон X-100, 1% NP40 (Nonidet-P40, неионный детергент нонилфенилполиэтиленгликоль), 2 мМ EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота), 0.2 мМ PMSF (ингибитор сериновых протеаз фенилметаносульфонилфторид) с ингибиторами протеаз. Чашки с клетками качали 10 минут при температуре +4°C. После этого клетки соскребали, отбирали их пипеткой и переносили в предварительно охлажденный эппендорф. Лизаты клеток центрифугировали 30 минут на скорости 12000 g при +4°C. Супернатант отбирали в отдельный эппендорф и добавляли к нему 5-кратный Lammi Buffer, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 5 минут при температуре +100°C.

Хранение лизатов осуществляли при минус 20 °С.

2.5. Электрофорез и иммуноблоттинг

Белки лизатов разделялись электрофоретически в 8%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (0.1%) и переносились на PVDF мембрану влажным переносом. Предварительно PVDF-мембрана помещалась в чистый метанол на 3 с, затем на 2–4 минуты в дистиллированную воду и на 15 минут в Transfer Buffer следующего состава: 48 мМ трис, 39 мМ глицин, 5% метанол.

Для выявления белков на иммуноблоте использовались:

- моноклональные антитела против STIM1 (610954, BD Biosciences, США) в разведении 1:250. В качестве вторичных антител брали козы антитела против константной части иммуноглобулинов мыши (A0168, Sigma, США, 1:30000).
- Поликлональные антитела против TRPC1 (ACC-010, Alomone, Израиль) в разведении 1:200. В качестве вторичных антител брали козы антитела против константной части иммуноглобулинов кролика (AO545-1ML, Sigma, США, 1:30000)
- Поликлональные антитела против Orail (O8264, Sigma, США) в разведении 1:1000. В качестве вторичных антител брали козы антитела против константной части иммуноглобулинов кролика (AO545-1ML, Sigma, США, 1:30000)

Белки на иммуноблотах выявляли с применением субстрата SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (PL211119A, Thermo Fisher Scientific, США), используя прибор ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Для контроля равной загрузки дорожек результаты нормировались на белок α -тубулин, для выявления которого использовали моноклональные антитела (T9026-2ML, Sigma, США) в разведении 1:1000. Чтобы исключить неспецифическое связывание, мембраны в течение 1 ч инкубировались в присутствии 5%-ного сухого молока. Эксперименты были повторены минимум 3 раза с использованием различных лизатов клеток.

Результаты и обсуждение

3.1. В клетках SK-N-SH, моделирующих болезнь Хантингтона и экспрессирующих HAP1A, уменьшен тапсигаргин-индуцированный вход кальция

Известно, что мутантный Htt способен вызывать дестабилизацию кальциевой сигнализации, влияя на вход кальция через каналы плазматической мембраны, экспрессию кальций-связывающих белков, потенциал на митохондриальной мембране. Еще одним направлением воздействия мутантного хантингтина является более выраженная по сравнению с нормальным белком ассоциация с рецептором инозитол-1,4,5-трифосфата 1 (IP₃R1) [4]. Связываясь с С-концом IP₃R1, мутантный Htt увеличивает его аффинность к своему лиганду, что может приводить к опустошению кальциевых депо уже при базальном уровне IP₃ (инозитол-1,4,5-фосфата). В свою очередь, снижение концентрации ионов кальция в депо способно дестабилизировать работу депо-управляемых каналов в сторону увеличения притока кальция в цитозоль.

Ранее нашей лаборатории было показано, что в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, в которых был проэкспрессирован полноразмерный мутантный белок хантингтин со 138 глутаминовыми повторами, наблюдается аномальное увеличение входа кальция через депо-управляемые каналы.

Было показано, что с Htt связывается белок HAP1 (Huntingtin-associated protein). При этом, чем длиннее полиглутаминовый тракт в белке Htt, тем связь крепче. У человека найдена единственная изоформа белка HAP1, у грызунов найдены HAP1A и HAP1B, HAP1A наиболее схожа с изоформой, найденной у человека. Также, было показано, образование троичного белкового комплекса IP₃R1-HAP1A-mHtt, еще сильнее увеличивает аффинность IP₃R1 к своему лиганду [4]. Этот факт позволяет предположить, что экспрессия HAP1A в клетках, в которых был проэкспрессирован mHtt, приведет к дополнительной

дестабилизации содержания кальция в депо и еще большему увеличению депо-управляемого кальциевого входа.

Поэтому целью данной работы было выявить влияние экспрессии NAR1A на уровень депо-управляемого кальциевого входа в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, моделирующих болезнь Хантингтона [33].

Для проведения экспериментов по электрофизиологической регистрации кальциевых токов активацию депо-управляемых каналов осуществляли с помощью аппликации к внешней стороне клеточной мембраны 1мкМ раствора тапсигаргина. Тапсигаргин проникает через ПМ и необратимо связывается с АТФазой ЭР SERCA, осуществляющей закачивание кальция из цитозоля во внутриклеточное депо, тем самым блокируя ее. Это вызывает пассивный выход кальция из внутриклеточного депо в цитозоль. При этом, тапсигаргин не вызывает активации каких-либо мембранных рецепторов, поэтому тапсигаргин-индуцированный вход кальция в клетку можно приписать исключительно работе депо-управляемых кальциевых каналов [35].

Регистрация ионных токов проводилась с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в отведении от целой клетки (конфигурация whole cell). Записанные токи нормировались на емкость мембраны клетки. Токи, зарегистрированные до аппликации тапсигаргина, использовались как матрица для вычитания.

Электрофизиологические измерения показали, что в контрольных клетках SK-N-SH Htt138Q GFP средняя амплитуда тапсигаргин-индуцированных токов (отнесенных к емкости) на стационарном уровне развития составила $3,50 \pm 0,32$ пА/пФ, что совпадает по значению с ранее полученными данными. В клетках, экспрессирующих NAR1A (SK-N-SH Htt138Q NAR1A), значение средней амплитуды тапсигаргин-индуцированных токов (отнесенных к емкости) на стационарном уровне развития составило $1,83 \pm 0,17$ пА/пФ. (Рис. 1А-В).

Таким образом, экспрессия HAP1A в SK-N-SH Htt 138Q привела к статистически достоверному двукратному снижению тапсигаргин-индуцированных токов. Статистическая значимость различий уровней депо-управляемого кальциевого входа была подтверждена однопараметрическим дисперсионным анализом ANOVA с поправкой Бонферони на уровне значимости $p < 0.05$ с предварительным проведением теста на нормальность Шапиро-Уилка и теста Левена на равенство дисперсий.

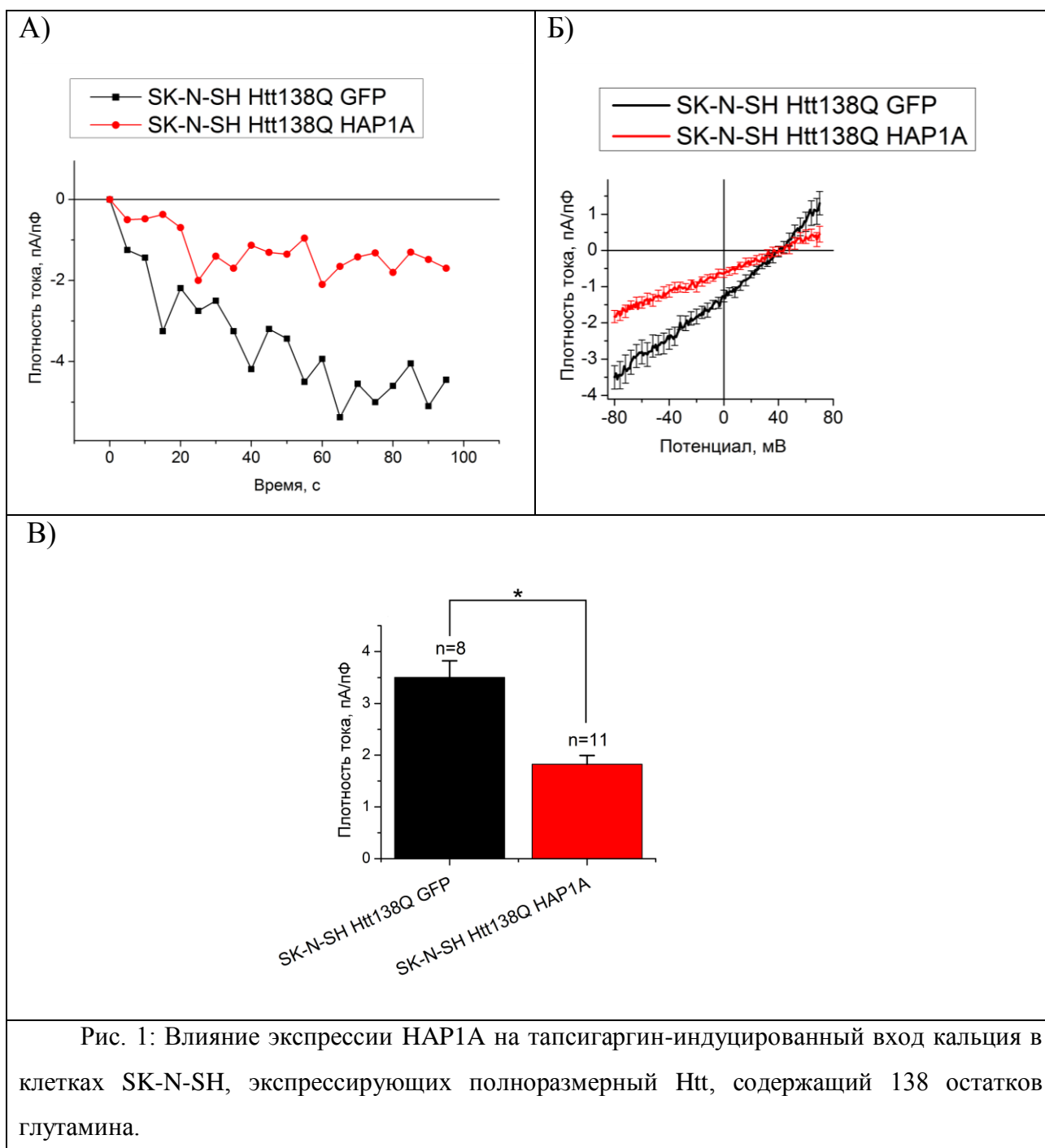


Рис. 1: Влияние экспрессии HAP1A на тапсигаргин-индуцированный вход кальция в клетках SK-N-SH, экспрессирующих полноразмерный Htt, содержащий 138 остатков глутамина.

А - Развитие тока (отнесенного к емкости клеток), вызванное приложением 1мкМ раствора тапсигаргина при потенциале минус 80 мВ в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A (красные круги); в контрольных клетках SK-N-SH Htt138Q GFP (черные квадраты). Представлены данные двух репрезентативных экспериментов.

Б - Средние вольт-амперные характеристики (нормированные на емкость) тапсигаргин-индуцированных токов, построенные для максимального уровня развития токов в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A (красная линия) и в клетках SK-N-SH Htt138Q GFP (черная линия). Данные представлены с указанием стандартной ошибки среднего.

В - Стационарный уровень развития депо-управляемых токов кальция при потенциале минус 80мВ при аппликации 1 мкМ тапсигаргина в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A (красная заливка) и в клетках SK-N-SH Htt138Q GFP (черная заливка). Данные представлены в виде столбчатой диаграммы с указанием средней величины, стандартной ошибки среднего и количества экспериментов. Статистически различимые результаты ($p < 0.05$) отмечены *.

3.2. Экспрессия HAP1A не влияет на экспрессию белков STIM1, TRPC1 и Orai1, участвующих в поддержании депо-управляемого входа кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q

Полученные результаты, демонстрирующие снижение входа кальция через депо-управляемые каналы в клетках SK-N-SH Htt138Q при экспрессии HAP1A оказались несколько неожиданными. Основываясь на предварительном анализе литературных данных, мы предполагали, что образование комплекса IP₃R1-HAP1A-mHtt может привести к дестабилизации работы внутриклеточных депо и увеличению депо-управляемого входа, но не к уменьшению.

Поэтому мы предположили, что наблюдаемое уменьшение амплитуды депо-управляемых токов может быть вызвано изменением экспрессионного профиля белков, отвечающих за депо-управляемый вход кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q вследствие оверэкспрессии в этих клетках белка HAP1A.

Таким образом, следующим этапом работы стала проверка влияния оверэкспрессии белка HAP1A на экспрессионный профиль белков, принимающих участие в механизме депо-управляемого входа кальция: а

именно, белков-сенсоров кальция в люмене ЭР STIM, а также белков ПМ, формирующих ионные кальциевые каналы: TRPC и Orai.

Семейство белков STIM образуют два представителя: STIM1 и STIM2. STIM1 сильнее связывает кальций, чем STIM2 и считается более сильным активатором депо-управляемых-каналов, чем STIM2. Поэтому, в первую данную работу мы сосредоточились на проверке влияния экспрессии HAP1A на экспрессию STIM1.

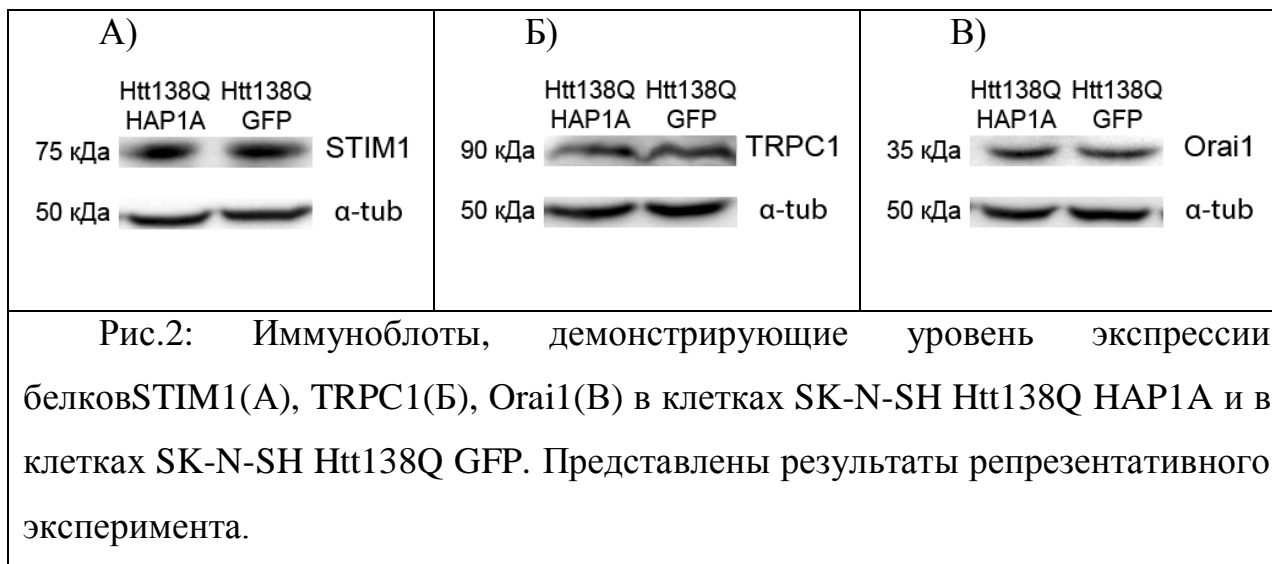
Другим очевидным кандидатом для проверки стал белок TRPC1. Белки семейства TRPC также вовлечены в депо-управляемый кальциевый вход, однако, данные для некоторых белков этого семейства весьма противоречивы. Наилучшим образом участие в формировании кальциевых каналов, активируемых по депо-управляемому механизму, было показано для белка TRPC1 [26]. В частности, в нашей лаборатории ранее было показано, что TRPC1 содержащие каналы опосредуют депо-управляемый вход кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q [36].

Также в мире считается, что основной пул депо-управляемых каналов представлен так называемыми CRAC-каналами, образованными белками семейства Orai. CRAC каналы являются низкопроводящими и высокоселективными депо-управляемыми кальциевыми каналами и представляют собой гексамеры, образованные шестью субъединицами Orai1[37].

Для определения уровня экспрессии белков STIM1, TRPC1 и Orai1 было проведено электрофоретическое разделение белков в ПААГ с последующим выявлением белков на иммуноблоте с использованием специфических антител.

Контроль равномерной загрузки дорожек осуществлялся по выравниванию мажорного белка α -тубулина. Все иммуноблоты были повторены трижды с использованием различных лизатов клеток.

По результатам иммуноблотов не было выявлено влияния экспрессии белка HAP1A на экспрессию белков STIM1, TRPC1 и Orai1 (рис. 2А-В). Таким образом, изменение экспрессии белков, вовлеченных в поддержание депо-управляемого входа кальция, вероятнее всего, не является причиной снижения тапсигаргин-индуцированных токов в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A.



3.3. Экспрессия HAP1A ведет к появлению конститутивной активности депо-управляемых кальциевых каналов

Не получив данных, свидетельствующих об изменении экспрессии основных белков, отвечающих за депо-управляемый вход кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A, мы предположили, что экспрессия HAP1A вкупе с экспрессией мутантного Htt способна столь сильно влиять на содержание кальция в депо, что часть депо-управляемых каналов в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A может быть активна в отсутствие внешних стимулов, в том числе до аппликации тапсигаргина. Ток через конститутивно активные каналы входит в число токов, которые использовались как матрица для вычитания. В таком случае, доля тапсигаргин-индуцированных токов среди всех депо-управляемых токов кальция становилась бы меньше.

Для проверки данной гипотезы мы использовали ионы гадолиния (1 мкМ), которые считаются относительно селективным блокатором депо-управляемого входа кальция [35]. Сначала в камеру подавался 1мкМ тапсигаргина и

записывался ток, вызванный пассивным опустошением депо. После достижения максимального стационарного уровня тапсигаргин-индуцированного тока в камеру подавался раствор, содержащий 1мкМ хлорида гадолиния, с целью заблокировать депо-управляемый ток кальция. При этом, происходило полное блокирование депо-управляемых каналов, как тапсигаргин-индуцированных, так и конститутивно активных, и амплитуды токов выходили на истинное нулевое значение. Поэтому для того, чтобы оценить амплитуду тапсигаргин-индуцированных токов в качестве матрицы для вычитания использовались токи, записанные до подачи тапсигаргина. В том же случае, когда мы хотели оценить амплитуду депо-управляемых токов в целом, включая ток через конститутивно активные каналы, в качестве матрицы для вычитания использовались токи, записанные уже после полного блокирования депо-управляемых каналов ионами гадолиния.

Электрофизиологические измерения показали, что средняя амплитуда тапсигаргин-индуцированных токов (отнесенных к емкости) на стационарном уровне развития составила $3,85 \pm 0,45$ пА/пФ в клетках SK-N-SH Htt138Q GFP и $2,24 \pm 0,38$ пА/пФ в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A. Средняя амплитуда гадолиний-чувствительных токов (отнесенных к емкости) в клетках SK-N-SH Htt138Q GFP составила $3,77 \pm 0,46$ пА/пФ, в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A $3,42 \pm 0,49$ пА/пФ (Рис. 3 А,Б,Г)

Так как количество экспериментов было мало, для подтверждения статистической значимости результатов электрофизиологических измерений использовался непараметрический критерий Манна-Уитни-Уилкоксона с уровнем значимости $p < 0.05$.

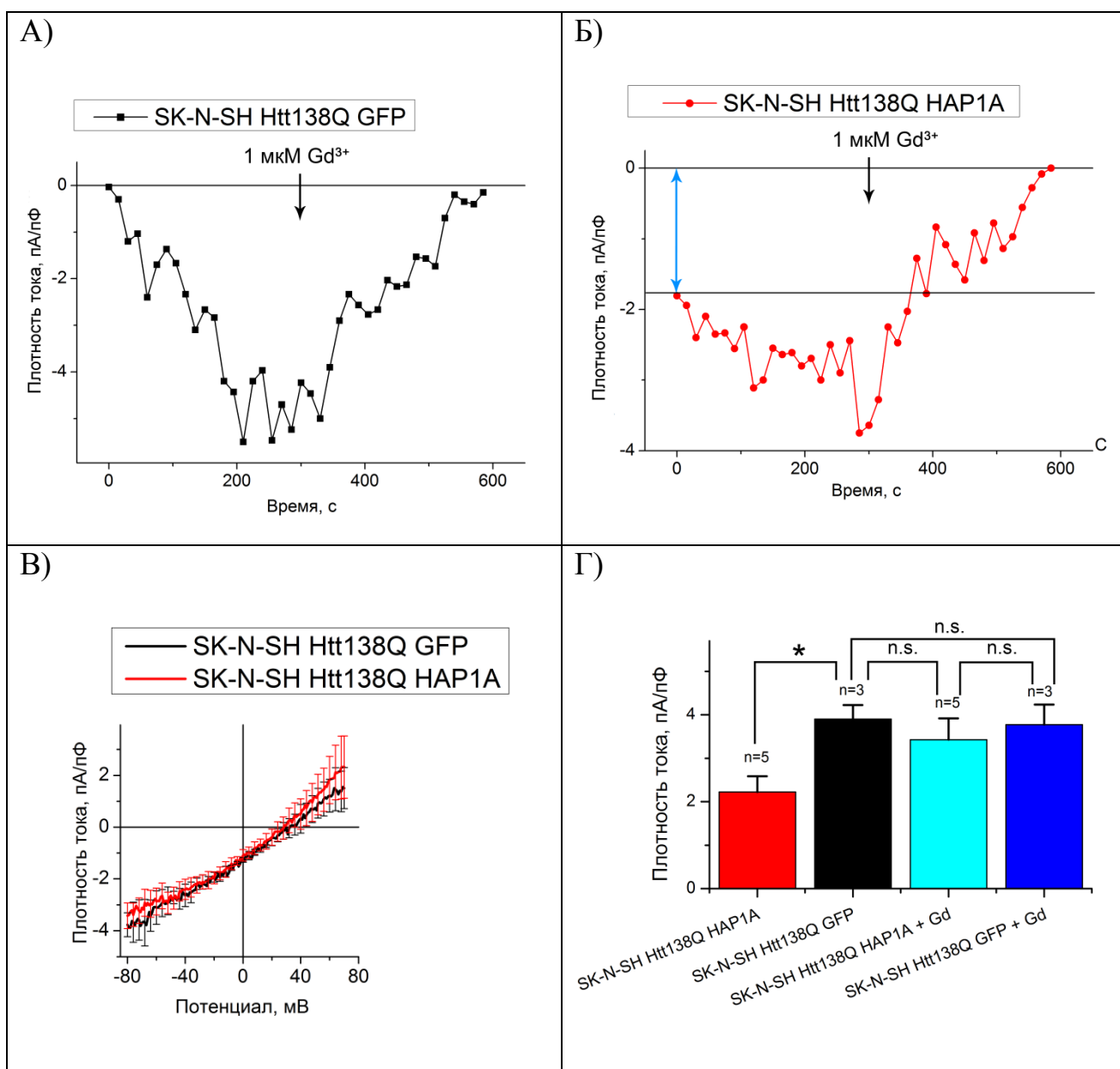


Рис. 3: Влияние экспрессии HAP1A на тапсигаргин-индуцированный вход кальция и последующее ингибирование депо-управляемого входа кальция в клетках SK-N-SH, экспрессирующий полноразмерный Htt, содержащий 138 остатков глутамина.

А- Развитие тока (отнесенного к емкости клеток), вызванное приложением 1мкМ тапсигаргина и его инактивация, вызванная ионами гадолиния, при потенциале минус 80 мВ в контрольных клетках SK-N-SH Htt138Q GFP (черные квадраты). Представлены данные одного репрезентативного эксперимента. Черная стрелка указывает на время приложения 1мкМ гадолиния хлорида.

Б - Развитие тока (отнесенного к емкости клеток), вызванное приложением 1мкМ тапсигаргина и его инактивация ионами гадолиния при потенциале минус 80 мВ в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A (красные круги). Представлены данные одного репрезентативного эксперимента. Черная стрелка указывает на время приложения 1мкМ гадолиния. Голубая

стрелка показывает амплитуду тока через конститутивно активные депо-управляемые кальциевые каналы.

В - Средние вольт-амперные характеристики (нормированные на емкость) депо-управляемого кальциевого входа, полученные после добавления во внеклеточный раствор ионов гадолиния на стационарном уровне развития токов в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A (красная линия) и в клетках SK-N-SH Htt138Q GFP (черная линия). Данные представлены с указанием стандартной ошибки среднего.

Г - Стационарный уровень развития тапсигаргин-индуцированных токов кальция (отнесенных к емкости клеток) при потенциале минус 80 мВ в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A (красная заливка) и в клетках SK-N-SH Htt138Q GFP (черная заливка) и средняя амплитуда гадолиний-чувствительных токов (отнесенных к емкости клеток) кальция при потенциале минус 80 мВ в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A (голубая заливка) и в клетках SK-N-SH Htt138Q GFP (синяя заливка). Данные представлены в виде столбчатой диаграммы с указанием средней величины, стандартной ошибки среднего и количества экспериментов. Статистически неразличимые результаты отмечены как n.s., статистически различимые результаты отмечены * ($p < 0.05$).

Как видно из результатов электрофизиологических измерений, представленных на рисунке 3(А-Г), в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A существует разница между максимальным тапсигаргин-индуцированным током и токами, блокируемыми ионами гадолиния (т.е. всеми депо-управляемыми токами кальция). Таким образом, часть депо-управляемых кальциевых каналов была активна до аппликации тапсигаргина и входила в число токов, используемых как матрица для вычитания в первом эксперименте (см. п. 3.1.). Тапсигаргин, вызывая пассивное опустошение депо, активировал остальные неактивные депо-управляемые кальциевые каналы, и их доля в общем числе депо-управляемых каналов кальция была значительно меньше, что отражено в результатах первого эксперимента (рис. 1). Остальные депо-управляемые каналы в клетках SK-N-SH Htt138Q HAP1A были активны конститутивно, чего не наблюдалось для клеток SK-N-SH Htt138Q GFP (Рис. 3(А,Г)).

Таким образом, мы экспериментально показали, что экспрессия HAP1A в клетках SK-N-SH, моделирующих болезнь Хантингтона, вызывает статистически достоверное снижение амплитуды тапсигаргин-индуцированных токов. При этом, экспрессия HAP1A в клетках SK-N-SH Htt138Q не влияет на экспрессионный профиль белков Orai1, STIM1, TRPC1, поддерживающих депо-управляемый вход. Поэтому можно сделать вывод, что экспрессия HAP1A в клетках SK-N-SH Htt138Q вызывает появление значительной доли депо-управляемых кальциевых каналов активных конститутивно, не приводя, при этом, к увеличению числа самих каналов.

Выводы

1. Экспрессия белка NAP1A в клетках SK-N-SH Htt138Q приводит к двукратному снижению амплитуды тапсигаргин-индуцированных токов кальция.

2. Экспрессия белка NAP1A в клетках SK-N-SH Htt138Q не вызывает изменений в уровне экспрессии белков Orai1, STIM1, TRPC1, поддерживающих депо-управляемый вход кальция в данных клетках.

3. Амплитуда гадолиний-чувствительных токов кальция одинакова в клетках SK-N-SH Htt138Q GFP и SK-N-SH Htt138Q NAP1A.

4. Снижение тапсигаргин-индуцированного входа кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q, экспрессирующих белок NAP1A, объясняется появлением пула конститутивно активных депо-управляемых каналов.

Список литературы

1. Vonsattel J.P., Difiglia M. Huntington disease // *J Neuropathol Exp Neurol.* –1998. – 57(5). –P. 369–384.
2. Безпрозванный И. Б. Система кальциевой сигнализации при нейродегенерации // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). –2010. – 1. –P.80–88.
3. Bezprozvanny, I., Watras, J. & Ehrlich, B.E. Bell-shaped calcium response curves of Ins (1,4,5) P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum // *Nature.* – 1991. – 351. –P. 751–754.
4. Tang, T.-S., Tu, H., Chan, E.Y., Maximov, A., Wang, Z., Wellington, C.L., Hayden, M.R. & Bezprozvanny, I. Huntingtin and huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) triphosphate receptor type 1 // *Neuron.* –2003. –39. –P. 227–239.
5. Li SH, Hosseini SH, Gutekunst CA, Hersch SM, Ferrante RJ, Li XJ. A human HAP1 homologue. Cloning, expression, and interaction with huntingtin // *J Biol Chem.* –1988. – 273. –P.19220–19227.
6. Parekh A.B., Putney J.W. Store-Operated Calcium Channels // *Physiol. Rew.* – 2005. – 85. –P. 757–810.
7. Brandman O., Liou J., Park W.S., Meyer T. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels // *Cell.* – 2007. – 131(7). – P.1327–1339.
8. Muik M., Fahrner M., Derler I., Schindl R., Bergsmann J., Frischauf I., Groschner K., Romanin C. A Cytosolic Homomerization and a Modulatory Domain within STIM1 C Terminus Determine Coupling to Orai1 Channels // *J Biol Chem.* – 2009. – 284(13). – P.8421–8426.
9. Martin D., Bootman, Tony J., Collins, Claire M. Calcium signalling - An overview // *Semin Cell Dev Biol.* –2001. – 12(1). –P.3–10.
10. Moreno Davila H. Molecular and functional diversity of voltage-gated calcium channels // *Ann N Y Acad Sci.* – 1999. – 868. – P.102–117.

11. Poggioli J., Putney J.W. Net calcium fluxes in rat parotid acinar cells: evidence for a hormonesensitive calcium pool in or near the plasma membrane // *Pflugers Arch.* – 1982. – 392(3). – P.239–243.
12. Bouron A., Altafaj X., Boisseau S., De Waard M. A store-operated Ca²⁺ influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca²⁺ stores is developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice // *Brain Res. Dev. Brain Res.* – 2005. – 159(1). – P.64–71.
13. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная Биология Клетки // Москва. Мир. – 1994. – 2. – С.359.
14. Berridge M. Neuronal Calcium Signaling // *Neuron.*–1998. – 21. – P. 13–26.
15. Hoth M., Penner R. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. // *Nature.* – 1992. – 355. – P.353 – 356.
16. Hou X., Pedi L., Diver M. M., Long S. B. Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai // *Science.* – 2012. – 338(6112). – P.1308–1313.
17. Skopin A., Shalygin A., Vigont V., Zimina O., Glushankova L., Mozhayeva G. N., Kaznacheeva E. TRPC1 protein forms only one type of native store-operated channels in HEK293 cells // *Biochimie.* – 2013. – 95(2). – P.347–353.
18. Harjes P., Wanker E.E. The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories // *Trends Biochem Sci.* – 2003. –28(8). – P. 425–433.
19. Ehrnhoefer D.E., Sutton L., Hayden M.R. Small changes, big impact: posttranslational modifications and function of huntingtin in Huntington disease // *Neuroscientist.* – 2011. – 17(5). – P. 475–492.
20. Difiglia M., Sapp E., Chase K.O., Davies S.W., Bates G.P., Vonsattel J.P., Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain // *Science.* –1997. – 277(5334). – P. 1990–1993.

21. Francelle L., Galvan L., Brouillet E. Possible involvement of self-defense mechanisms in the preferential vulnerability of the striatum in Huntington's disease // *Front Cell Neurosci.* – 2014. – 8. – P:295.
22. Hinckelmann M., Zala D., Saudou F. Releasing the brake: restoring fast axonal transport in neurodegenerative disorders // *Trends Cell Biol.* – 2013. – 23(12). – P.634–643.
23. Panov A.V., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., Hayden M.R., Burke J.R., Strittmatter W.J., Greenamyre J.T. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines // *Nat. Neurosci.* – 2002. – 5(8). – P.731–736.
24. Plotkin J.L., Surmeier D.J. Corticostriatal synaptic adaptations in Huntington's disease // *Curr Opin Neurobiol.* – 2015. – 33. – P.53–62.
25. Wu J., Ryskamp D.A., Liang X., Egorova P., Zakharova O., Hung G., Bezprozvanny I. Enhanced Store-Operated Calcium Entry Leads to Striatal Synaptic Loss in a Huntington's Disease Mouse Model // *J Neurosci.* – 2016. – 36(1). – P.125–141.
26. Vigont V., Kolobkova Y., Skopin A., Zimina O., Zenin V., Glushankova L., Kaznacheeva E. Both Orail and TRPC1 are Involved in Excessive Store-Operated Calcium Entry in Striatal Neurons Expressing Mutant Huntingtin Exon 1 // *Front Physiol.* – 2015. – 6. – P.337.
27. Luthi-Carter R., Strand A., Peters N.L., Solano S.M., Hollingsworth Z.R., Menon A.S., Frey A.S., Spektor B.S., Penney E.B., Schilling G., Ross C.A., Borchelt D.R., Tapscott S.J., Young A.B., Cha J.H., Olson J.M. Decreased expression of striatal signaling genes in a mouse model of Huntington's disease // *Hum Mol Genet.* – 2000. – 9(9). – P.1259–1271.
28. Gerfen C.R., Baimbridge K.G., Miller J.J. The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey // *Proc Natl Acad Sci U S A.* –1985. –82(24). – P.8780–8784.

29. Tang T.S., Slow E., Lupu V., Stavrovskaya I.G., Sugimori M., Llinás R., Kristal B.S., Hayden M.R., Bezprozvanny I. Disturbed Ca²⁺ signaling and apoptosis of medium spiny neurons in Huntington's disease // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2005. – 102(7). – P.2602–2607.
30. Fan M.M., Fernandes H.B., Zhang L.Y., Hayden M.R., Raymond L.A. Altered NMDA receptor trafficking in a yeast artificial chromosome transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* – 2007. – 27. – P.3768–3779.
31. Giacomello M1, Oliveros JC, Naranjo JR, Carafoli E. Neuronal Ca(2+) dyshomeostasis in Huntington disease // *Prion*. – 2013. – 7(1). – P.76–84.
32. Vosler P.S., Brennan C.S., Chen J. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration// *Mol. Neurobiol.* – 2008. – V. 38(1). – P. 78–100
33. Глушанкова Л.Н., Зимина О.А., Вигонт В.А., Можаяева Г.Н., Безпрозванный И.Б., Казначеева Е.В. Изменение депоуправляемого входа кальция в клеточной модели болезни Хантингтона // *ДАН*. – 2010. – 433(6). – С. 842–845.
34. Tang TS, Tu H, Orban PC, Chan EY, Hayden MR, Bezprozvanny I. NRP1 facilitates effects of mutant huntingtin on inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in primary culture of striatal medium spiny neurons // *Eur J Neurosci.* – 2004. – 20(7). – P.1779–1787.
35. Putney J. Pharmacology of Store-operated Calcium Channels//*Mol Interv.* –2010. –10(4): – P.209–218.
36. Wu J, Shih HP, Vigont V, Hrdlicka L, Diggins L, Singh C.Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment // *Chem Biol.* –2011. – 24(18). – P.777–793.
37. Hou X, Pedi L, Diver M, Long S. Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai // *Science*. –2012. –338(6112). – P.1308–1313.