

УДК 577.352.465

Болезнь Хантингтона: нарушения кальциевой сигнализации и модели для изучения развития патологии

Ю. А. Колобкова, В. А. Вигонт, А. В. Шалыгин, Е. В. Казначеева*

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

*E-mail: evkzn@incras.ru

Поступила в редакцию 14.07.2016

Принята к печати 27.03.2017

РЕФЕРАТ Болезнь Хантингтона (БХ) – это тяжелое наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся моторной дисфункцией, снижением когнитивных способностей и психическими расстройствами. БХ обусловлена мутацией в первом экзоне гена, кодирующего белок хантингтин, которая приводит к увеличению полиглутаминового тракта в N-концевой области хантингтина и развитию тяжелой нейродегенеративной патологии. Есть все основания рассматривать нарушение кальциевого гомеостаза в качестве одной из ключевых причин развития патологии, что объясняет повышенный интерес к данной проблеме специалистов в области молекулярной физиологии. Большое внимание уделяется созданию животных моделей и пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (HDiPSC), имитирующих развитие заболевания. Несмотря на полуторавековую историю исследований БХ, необходимо констатировать, что проблемы манифестации и диагностики данной патологии актуальны и по сей день. Перечисленные проблемы нашли отражение в настоящем обзоре.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Хантингтона, кальций, нейродегенерация, хантингтин, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (HDiPSC), SOC.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БХ – болезнь Хантингтона; ПМ – плазматическая мембрана; ЭР – эндоплазматический ретикулум; $[Ca^{2+}]$ – концентрация ионов кальция; (HD)iPSC – (специфичные для БХ) индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; InsP₃ – инозитол-1,4,5-трисфосфат; InsP₃R – рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата; (m)Htt – (мутантный) хантингтин; Q – остаток глутамина; MSN – срединные шипиковые нейроны стриатума; SOC(E) – депо-управляемый кальциевый (вход).

ВВЕДЕНИЕ

Наследственная природа болезни Хантингтона (БХ) была установлена и описана Джорджем Хантингтоном в его оригинальной рукописи почти полтора века назад [1]. БХ, наследуемая по аутосомно-доминантному типу, обусловлена мутацией, которая приводит к увеличению количества САG-повторов в гене белка хантингтина (Htt), локализованного на хромосоме 4p16.3. В результате данной мутации в N-концевой области белка Htt увеличивается количество остатков глутамина (Q), что различными путями приводит к наблюдаемым патологиям [2]. В норме полиглутаминовый тракт содержит не более 35 остатков глутамина [3]. Для болезни Хантингтона характерна избирательная гибель ГАВАергических нейронов стриатума [3], в то время как при болезни Паркинсона поражаются в основном дофаминергические нейроны черной субстанции [4], а при болезни Альцгеймера наблюдается

преимущественная гибель нейронов гиппокампа [5]. На сегодняшний день известно несколько механизмов, вносящих вклад в патогенез БХ, включая новые токсические свойства мутантного Htt (mHtt), одновременно с нарушением функций нормального Htt [6]. Данные изменения приводят к нарушению регуляции транскрипции гена, кодирующего Htt [7], синаптической дисфункции и эксайтотоксичности [8, 9], нарушению гомеостаза mHtt [10], дефектам внутриклеточного транспорта [11], митохондриальной дисфункции [12–14] и нарушениям кальциевой сигнализации [15–17].

МАНИФЕСТАЦИЯ И ДИАГНОСТИКА БХ

Распространенность БХ достаточно велика: частота заболевания составляет примерно 1 : 1000000 у людей с азиатским и африканским происхождением и 5–10 : 100000 у лиц европеоидной расы, не считая множества людей, входящих в группу риска. У муж-

чин БХ встречается чаще, чем у женщин, проявляется преимущественно после 30 лет и обычно приводит к летальному исходу через 15–20 лет после появления первых симптомов. В то же время наличие длинных полиглутаминовых трактов может быть причиной ювенильной или даже инфантильной формы БХ. Мутации, увеличивающие длину глутаминовых повторов до 36–40Q, обладают неполной пенетрантностью; повторы длиной более 41Q полностью пенетрантны [18].

Длина полиглутаминового тракта в mHtt прямо коррелирует со степенью тяжести заболевания и в подавляющем большинстве случаев обратно коррелирует с возрастом появления первых симптомов [19]. Тем не менее, существует значительная вариабельность между ожидаемым и наблюдаемым возрастом манифестации [20]. Так, при одинаковой длине полиглутаминового тракта, особенно в диапазоне 40–44Q, возраст манифестации может отличаться на 20 лет [21]. Подобное различие можно объяснить присутствием ряда генетических модификаторов, регулирующих экспрессию как Htt, так и других белков, и опосредующих таким образом повышенную чувствительность либо устойчивость к заболеванию. Например, полиморфизм S18Y в гене, кодирующем убиквитин-С-концевую гидролазу UCH-L1, связан с более поздней манифестацией БХ [22]. У пациентов с мутацией M441T в гене белка, ассоциированного с Htt (Har1), БХ проявлялась в более раннем возрасте за счет ослабления взаимодействия Har1 с mHtt и, как следствие, повышения опосредованной Htt токсичности [23]. Недавно показали, что однонуклеотидный полиморфизм в промоторе гена *Htt*, расположенный в сайте связывания с фактором NF-κB, снижает активность промотора и, как следствие, экспрессию Htt, что приводит к более поздней манифестации БХ [24].

Однако генетической мутации недостаточно как для прогнозирования индивидуального риска заболеваний, так и для оценки текущих физиологических процессов в организме. Поэтому для разработки новых лекарственных средств, определения эффективности лечения и влияния факторов внешней среды важна идентификация биомаркеров прогрессирования БХ, которые могут дать информацию о патологических процессах до проявления клинических симптомов. К недавним достижениям диагностики можно отнести количественное определение уровня mHtt с помощью сверхчувствительного иммунологического анализа одиночных молекул в образцах цереброспинальной жидкости лиц, несущих мутацию в этом гене [25].

Так как Htt экспрессируется практически во всех тканях организма, изменения, вызываемые mHtt,

могут быть обнаружены даже в крови. Участие лейкоцитов в иммунном ответе делает анализ крови идеальным способом выявления таких патологических процессов при БХ, как периферические воспаления. При БХ в крови увеличена экспрессия продукта гена *Y* гистонов семейства H2A [26]. В ходе клинических исследований показано, что экспрессия этого гена как в образцах крови, так и в тканях мозга при БХ в 1.6 раза выше, чем в контрольной группе. С помощью технологий секвенирования нового поколения и Fluidigm выявлено пять генов, кодирующих потенциальные биомаркеры БХ, детектируемые в крови пациентов [27]. Установлена корреляция между когнитивными нарушениями при БХ и уровнями пептидного гормона прокинетина 2 (PROK2), участвующего в регуляции циркадных ритмов [28]. Таким образом, PROK2 рассматривается как один из многообещающих маркеров прогрессирования БХ. В крови пациентов с БХ обнаружено также повышение уровня мРНК аквапорина 9 [29].

Изменчивость клинического фенотипа БХ и потенциальное влияние совокупности экологических и фармакологических факторов приводят к необходимости комбинирования различных маркеров прогрессирования БХ. Снижение уровня N-ацетиласпартата (NAA) в тканях мозга считается достоверным индикатором дисфункции и гибели нейронов и, что важно для клинической диагностики, может быть измерено неинвазивно с помощью МРТ [30]. Оказалось, что у пациентов с ранней манифестацией БХ уровень NAA ниже, чем в контрольной группе. В то же время у них существенно повышен уровень миоинозита – маркера глиоза [31]. Связь между уровнем NAA и степенью тяжести заболевания открывает возможность использования данного метаболита в качестве идентификатора нейрохимических реакций при оценке эффективности потенциальных терапевтических агентов.

В сыворотке крови при БХ увеличивается концентрация вазопрессина, играющего важную роль в гомеостазе жидкостей организма [32], а также 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (индикатора окислительного повреждения ДНК); продуктов перекисного окисления липидов (молочной кислоты, 4-гидроксиноненала и малондиальдегида), что позволяет рассматривать эти вещества как потенциальные биомаркеры [33]. В эритроцитах пациентов с БХ наблюдалось снижение уровня глутатионпероксидазы и Cu,Zn-супероксиддисмутазы [34], а в посмертных срезах мозга и образцах плазмы повышен уровень цитокинов, включая интерлейкины-4, -6, -8, -10, -23, TNF-α, а также кластерина [35].

Использование всех этих биомаркеров будет способствовать точной оценке эффективности новых ме-

тодов лечения, повысит безопасность и эффективность доклинических и клинических испытаний.

БЕЛОК ХАНТИНГТИН

Развитие БХ обусловлено мутацией в гене белка хантингтина. Хантингтин – белок с молекулярной массой около 350 кДа и полиглутаминовым трактом в N-концевой области. В той же области находится обогащенный остатками пролина домен, участвующий в белок-белковых взаимодействиях и предохраняющий хантингтин от агрегации [36]. Схема расположения доменов хантингтина человека представлена на *рис. 1*.

В клетке хантингтин выполняет функции скаффолд-белка, т.е. обеспечивает колокализацию взаимодействующих с ним белков, помогая им выполнять свои функции. С хантингтином взаимодействует множество белков (особенно с его N-концевой областью), осуществляющих самые разнообразные функции – от везикулярного транспорта и эндоцитоза до регуляции транскрипции и апоптоза [37].

Молекула хантингтина выглядит как соленоид с гидрофобным кором, сформированным из состыкованных HEAT-повторов. Эти повторы вместе с обогащенным пролином участком принимают участие в белок-белковых взаимодействиях. Свое название HEAT-повторы получили по первым буквам в обозначениях четырех белков, в которых они были впервые обнаружены (Huntingtin, Elongation factor

3, PR65/A –субъединица фосфатазы 2A и липидкиназа TOR) [38]. Структура коротких N-концевых фрагментов хантингтина изучена с помощью рентгеноструктурного анализа [39] и методом ядерного магнитного резонанса [40]. Недавно показали, что вторичная структура хантингтина меняется в зависимости от длины полиглутаминового тракта [41]. С помощью электронной микроскопии получены изображения нормального и мутантного хантингтинов, имеющих сферическую структуру с полостью [41]. Изображения Htt23Q и Htt78Q очень близки, однако влияние полиглутаминового тракта на структуру хантингтина предполагает, что при взаимодействии со своими белками-партнерами хантингтин может подвергаться значительным конформационным перестройкам [41]. Несмотря на сказанное, на сегодняшний день не до конца понятно, как связана структура хантингтина с его функциями, и как изменения его структуры в результате мутации приводят к наблюдаемым патологиям.

Считается, что БХ ассоциирована с отщеплением от мутантного хантингтина N-концевого фрагмента, который кодируется первым экзоном и содержит polyQ-тракт. Отщепленный фрагмент накапливается в ядре, в то время как хантингтин дикого типа локализован в основном в цитозоле [42, 43]. Выбор и изменение места, где будет находиться хантингтин, определяются посттрансляционными модификациями [44]. Накопление агрегированных N-концевых

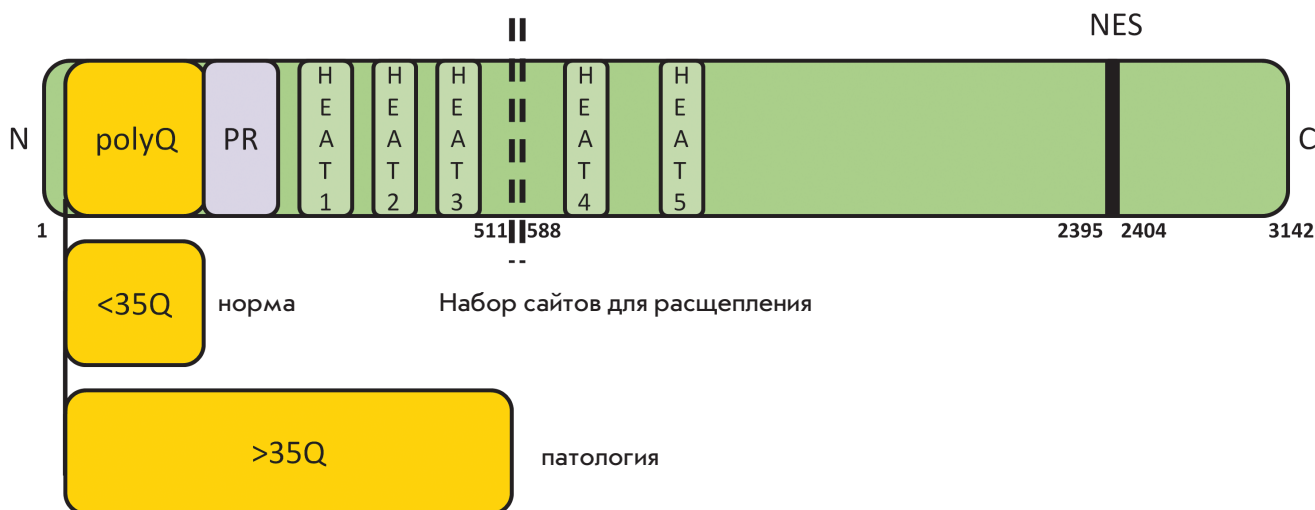


Рис. 1. Белок хантингтин. Схема расположения основных доменов хантингтина человека. Показаны polyQ – полиглутаминовый тракт, PR – обогащенный пролином домен, ответственный за взаимодействие с множеством белков, набор HEAT-повторов, область расщепления протеазами и NES – фактор экспорта в ядро

фрагментов mHtt в ядре и ассоциированных с ними белков, таких, как различные транскрипционные факторы, белки теплового шока и компоненты протеасом, затрудняет выполнение ими своих нормальных функций и, как следствие, приводит к различным патологиям в клетке [45].

К нейропатологическим маркерам БХ относятся внутриклеточные включения, образованные N-концевыми фрагментами mHtt, обнаруженные при посмертном исследовании мозга пациентов с БХ, а также в животных и клеточных моделях БХ [42, 46, 47]. Образование нерастворимых агрегатов при БХ не вызывает сомнения, однако многие исследования показывают, что этот процесс не связан непосредственно с дегенерацией нейронов. Так, экспрессия mHtt в культуре нейронов стриатума показала накопление нерастворимых белковых агрегатов, не коррелирующее с гибелью нейронов. Более того, уменьшение внутриядерных включений mHtt совпадало с усилением нейродегенеративных процессов [48]. Изучение нейронов, экспрессирующих первый экзон *mHtt*, также показало, что гибель нейронов коррелирует с увеличением длины полиглутаминового тракта и с количеством диффузного mHtt в клетке, в то время как накопление агрегатов лишь снижает количество растворенного mHtt и увеличивает таким образом выживаемость нейронов [49]. Считается, что за амилоидную токсичность ответственны нестабильные, гетерогенные префибриллярные агрегаты, тогда как зрелые фибриллы представляют собой стабильные и безвредные хранилища токсичных элементов [50].

Приведенные факты приводят к мысли, что образование агрегатов при БХ не может быть единственной причиной развития патологии, и выяснение молекулярных причин БХ остается актуальной задачей.

МОДЕЛИРОВАНИЕ БХ

Для изучения молекулярных механизмов нейродегенерации, равно как и для проведения исследований, связанных с поиском новых лекарств, исключительно важным представляется создание адекватных моделей заболевания. Так как БХ – это наследственное заболевание, обусловленное мутацией в единственном гене, существует возможность с помощью генетических манипуляций создавать различные модели, достаточно точно воспроизводящие патологию заболевания (рис. 2).

Мыши R6/2 обладают устойчивым фенотипом, включающим нарушение координации и походки, гипоактивность и когнитивную дисфункцию. Возраст манифестации заболевания в данной модели – порядка 4 недель [51]. У мышей R6/2 формируются

агрегаты, содержащие внутриклеточные включения, аналогичные обнаруженным в биопсийных образцах тканей мозга пациентов с БХ [52]. Однако, несмотря на устойчивость фенотипа, R6/2 не могут служить точной моделью БХ, так как экспрессируют только N-концевой фрагмент мутантного белка. Тем не менее, мышью R6/2 широко используют для моделирования общих черт полиглутаминовых заболеваний, включая аномальную конформацию белка, обусловленную расширенным polyQ-трактом.

Трансгенные мыши YAC128 и VACND, содержащие 128Q и 97Q в полном размере мутантного белка соответственно, имеют более мягкий фенотип БХ по сравнению с фенотипом, наблюдаемым в модели R6/2 [53].

Самый слабый фенотип БХ имеют мышинные модели knock-in. Даже при экспрессии 150Q у мышей HdhQ150/Q150 выявлено меньше нарушений, чем у R6/2. У мышей HdhQ150/Q150 первые симптомы заболевания, включающие моторную дисфункцию и нарушение походки, появляются в более позднем возрасте [54].

Несмотря на то что мышинные модели основаны на мутации, вызывающей заболевание, в большинстве из них отсутствует стабильная потеря нейронов, наблюдаемая у пациентов. Для преодоления этой проблемы требуются другие модельные организмы. Токсичность N-концевого фрагмента mHtt проявляется ярче при использовании крупных млекопитающих, таких, как свиньи и обезьяны, тогда как у овец, экспрессирующих полномасштабный mHtt, отсутствуют выраженные фенотипические признаки заболевания [55]. Однако, несмотря на ряд преимуществ, к существенным недостаткам этих моделей относятся высокая стоимость и необходимость специального лабораторного оборудования для содержания.

Drosophila melanogaster и *Caenorhabditis elegans* также используются для моделирования БХ. Преимуществом этих организмов является короткая продолжительность жизни и быстрое воспроизведение. Обнаружение у *Drosophila* ортолога Htt человека предполагает наличие у этих насекомых путей, необходимых для нормального функционирования Htt, что делает *Drosophila* хорошей моделью для изучения БХ [56]. Еще одна интересная особенность *Drosophila* как модели БХ – возможность легко оценивать нейродегенерацию визуально. Сверхэкспрессия mHtt у *Drosophila* приводит к формированию агрегатов, гибели нейронов и снижению выживаемости [57]. Кроме того, моделирование БХ на *Drosophila* позволяет воспроизвести такие симптомы, как моторная дисфункция, ухудшение когнитивных способностей и памяти [58]. У *C. elegans*, экспрессирующих в мышечных клетках polyQ-тракт, слитый с желтым флуоресцентным

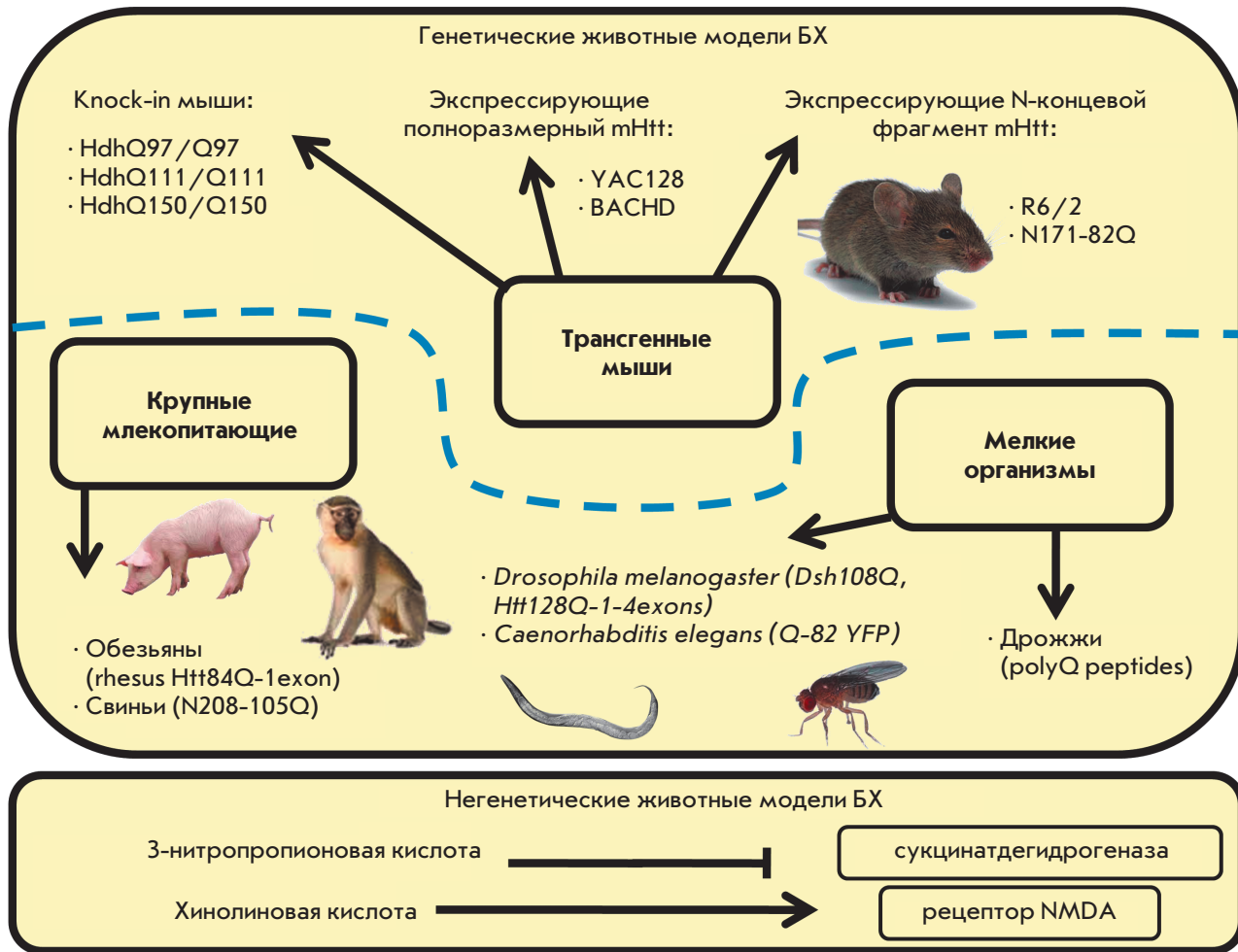


Рис. 2. Животные модели болезни Хантингтона

белком (YFP), наблюдали формирование агрегатов, клеточную токсичность и паралич, прямо коррелирующие с возрастом и количеством повторов Q [59]. Обе упомянутые модели активно используются для тестирования потенциальных лекарственных средств против БХ. Однако столь далекие от человека модели не способны в полной мере воспроизводить картину, наблюдаемую у пациентов с БХ. Так, например, экспрессия фрагментов Htt с полиглутаминовыми трактами с 88 или 128Q в *S. elegans* приводила к значительной нейрональной дисфункции и утрате чувствительности к прикосновению, не вызывая при этом гибели нейронов [60].

Достаточно часто используют дрожжевую модель БХ. Так, например, на дрожжах показаны различные патологические эффекты агрегации mHtt – нарушение эндоцитоза, метаболизма триптофана, клеточного цикла и деградации белков [61–63].

Существуют и негенетические животные модели БХ, основанные на использовании химических веществ (рис. 2). Так, например, 3-нитропропионовую и хинолиновую кислоты используют в качестве эксайтотоксических агентов в животных моделях БХ. Первое соединение является токсином, который действует на митохондрии и индуцирует нейротоксичность путем необратимого ингибирования сукцинатдегидрогеназы – ключевого фермента дыхательной цепи, ответственного за окисление сукцината в фумарат. Хинолиновая кислота является агонистом рецептора N-метил-D-аспартата. Эксайтотоксичность, вызванную этими соединениями, изучали на срезах стриатума, сагиттальных срезах гиппокампа [64], а также на срезах гиппокампа трансгенных мышей R6/2 [65].

Необходимо отметить, что многие патологические проявления, наблюдаемые при БХ, могут быть из-

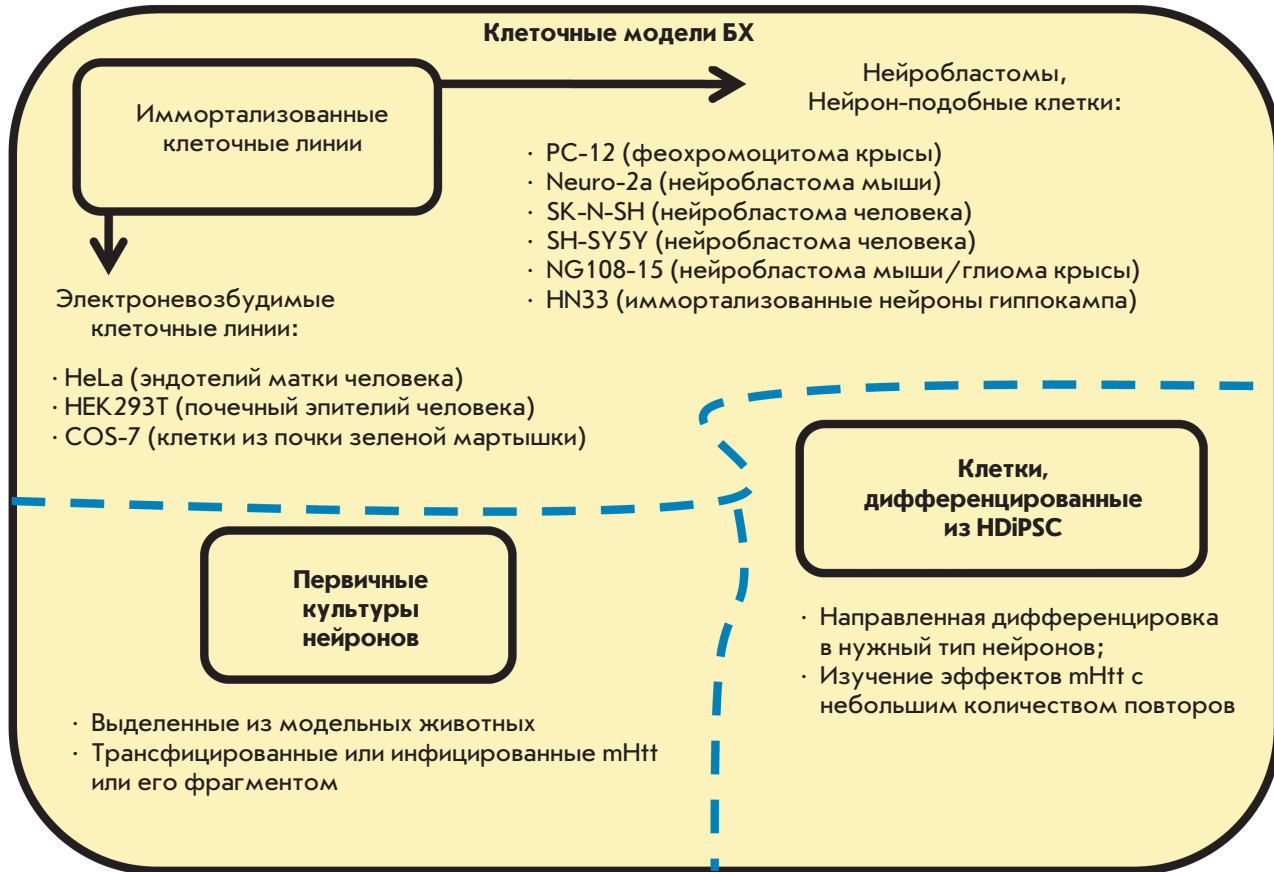


Рис. 3. Клеточные модели болезни Хантингтона

учены на клеточном уровне (рис. 3). Клетки могут быть трансфицированы как полноразмерным mHtt, так и его фрагментами с различной длиной polyQ-тракта. Например, трансфекция клеток PC-12 первым экзоном *mHtt* приводила к локализации mHtt в ядре, изменению морфологии и экспрессии генов, а также к снижению выживаемости [66].

Получено большое количество иммortalизованных клеточных линий, моделирующих БХ, однако они позволяют выявлять далеко не все патологические проявления БХ. Поэтому довольно часто используют первичные культуры нейронов, полученные из трансгенных мышей, моделирующих БХ [67–69], или нейроны, выделенные из животных дикого типа с последующим введением вектора для экспрессии mHtt или его фрагмента [16].

Интересной и перспективной моделью БХ являются кортикостриатальные срезы мозга крысы, трансфицированные конструкциями, экспрессирующими mHtt человека. Эта модель имеет преимущество перед простыми клеточными моделями, поскольку она поддерживает постоянное взаимодействие между

клетками, что важно при изучении патогенеза БХ [70]. Эта модель может быть использована для изучения действия потенциальных терапевтических агентов, эффективных при БХ.

Один из наиболее современных и многообещающих подходов к моделированию БХ и других нейродегенеративных заболеваний – использование пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (HDiPSC), в которых мутантные формы хантингтина экспрессируются эндогенно. Разработаны протоколы дифференцировки iPSC в фенотип, сходный с фенотипом срединных шипиковых нейронов стриатума (MSN) [71–73] – клеток, наиболее уязвимых при БХ. Одним из преимуществ HDiPSC является возможность изучения патологических процессов, связанных с экспрессией mHtt с небольшой длиной polyQ-тракта [73], которая, как правило, не вызывает патологических изменений в других моделях.

Экспрессия генов и белков в HDiPSC отличалась от экспрессии в контроле, наблюдались изменения в протеостазе, развитии нейронов, внутриклеточном

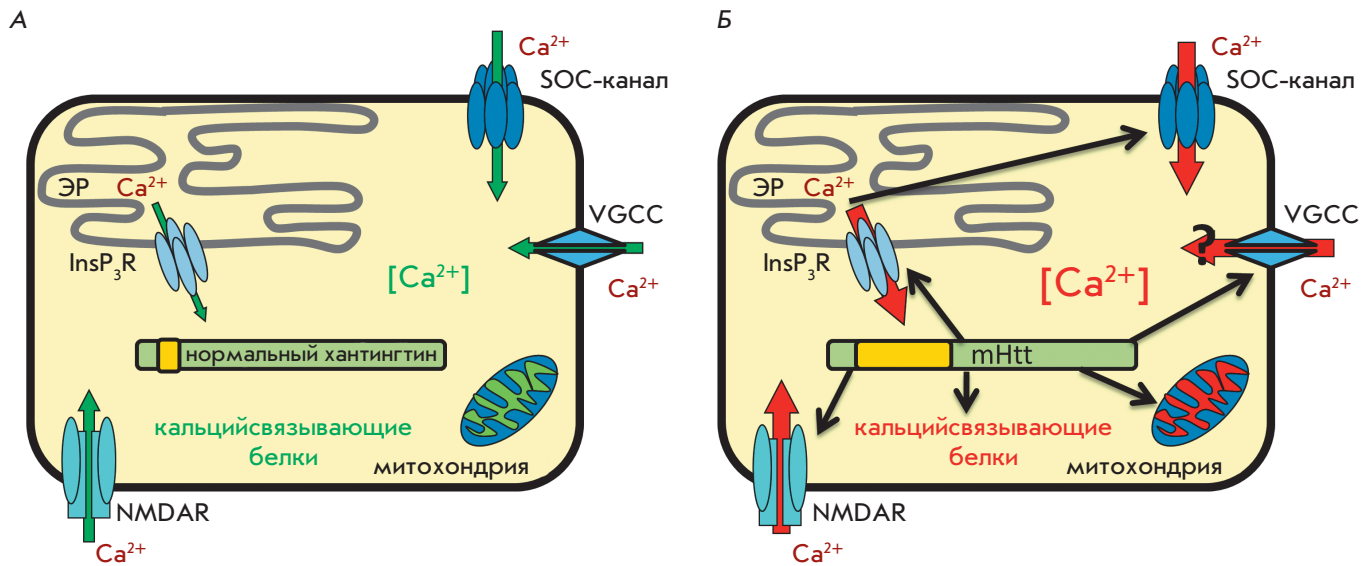


Рис. 4. Нарушения кальциевой сигнализации в клетках, экспрессирующих mHtt. **А** – основные пути регуляции кальциевого гомеостаза в нормальных клетках. Зелеными стрелками показаны основные потоки кальция в норме. **Б** – влияние экспрессии mHtt на кальциевый гомеостаз в клетках. Красными стрелками выделены основные потоки, патологически нарушенные или потенциально нарушенные при БХ. Красным цветом также показаны изменения проницаемости митохондриальной мембраны и нарушения в экспрессии и функции кальцийсвязывающих белков. Черными стрелками проиллюстрированы блоки кальциевой сигнализации, на которые влияет экспрессия mHtt. Обозначения на рисунках: ЭР – эндоплазматический ретикулум, NMDAR – рецептор N-метил-D-аспартата, VGCC – потенциал-управляемые кальциевые каналы, SOC-канал – депо-управляемый кальциевый канал, InsP₃R – рецептор инозитолтрифосфата

транспорте, метаболизме РНК и клеточном метаболизме [74]. Кроме того, степень нарушения экспрессии прямо коррелировала с длиной polyQ-тракта. Дифференцированные из HDiPSC нейроны имели ассоциированный с заболеванием фенотип, в том числе электрофизиологические изменения, изменения метаболизма, клеточной адгезии и клеточной токсичности. Клетки, содержащие самый длинный polyQ-тракт, были наиболее чувствительными к стрессу, например, к отсутствию в клеточной среде BDNF (Brain-derived neurotrophic factor). Изучение нейронов, дифференцированных из HDiPSC, выявило изменения в активности лизосом [73, 75], фрагментации митохондрий [76] и работе репрессоров транскрипции [77].

Еще одна сфера использования HDiPSC – трансплантация клеток для «замещения» больных клеток. Предшественники нейронов, дифференцированные из iPSC, имплантировали крысам, моделирующим БХ. При этом наблюдали восстановление нормального поведения [78]. Оказалось, что предшественники нейронов из HDiPSC в той же мере восстанавливали популяцию ГАВАергических нейронов стриатума и приводили к нормализации поведения крыс, однако

в данном случае на длительных сроках наблюдений пересаженные клетки начинали проявлять патологические свойства [78], что подчеркивает необходимость предварительной генетической коррекции при проведении аутологической трансплантации.

НАРУШЕНИЕ ГОМЕОСТАЗА КАЛЬЦИЯ ПРИ БХ

Нарушения кальциевой сигнализации характерны для различных нейродегенеративных заболеваний, таких, как БХ, болезни Альцгеймера и Паркинсона, боковой амиотрофической склероз [16, 79–81]. На животных моделях БХ, созданных с использованием генетически доставляемого mHtt или индуцированных 3-нитропропионой кислотой (3-NPA), показано, что нарушение кальциевой сигнализации является отличительной чертой БХ.

Влияние mHtt на кальциевую сигнализацию в клетке происходит сразу по многим направлениям, включая взаимодействие с кальцийсвязывающими белками, мембранами митохондрий, регуляцию притока кальция из внеклеточной среды и высвобождения кальция из внутриклеточных депо (рис. 4).

Среди главных участников нейрональной кальциевой сигнализации можно выделить кальцийсвязыва-

ющие белки, активирующиеся при связывании с Ca^{2+} и регулирующие уровень свободного Ca^{2+} ; белки, экспортирующие Ca^{2+} из цитозоля во внеклеточную среду (АТФ-азы плазматической мембраны, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменники) или в полость органелл (SERCA), а также кальциевые каналы, отвечающие за доставку Ca^{2+} в цитоплазму [82, 83].

mHtt взаимодействует непосредственно с кальцийсвязывающими белками [84], что может приводить к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и нарушению нормального функционирования этих белков [85]. В частности, взаимодействие mHtt с кальмодулином обнаружено в белковых комплексах с большой молекулярной массой [84], а нарушение этого взаимодействия оказывало нейропротекторный эффект [85, 86]. Одна из причин опасности длительного повышения уровня Ca^{2+} в цитозоле – активация кальпаина, Ca^{2+} -активируемой цистеиновой протеазы, действие которой практически необратимо. Кальпаин разрушает белки цитоскелета и другие примембранные белки. На *Drosophila*, моделирующей БХ, показано, что подавление кальпаина предотвращает агрегацию и токсичность mHtt, стимулируя аутофагию. Сверхэкспрессия кальпаина – ингибитора кальпаина, увеличивает количество аутофагосом и благоприятно влияет на мышей, моделирующих БХ, что делает этот процесс подходящим для разработки подходов к терапии БХ [87].

Важно отметить, что нарушение кальциевой сигнализации при БХ происходит еще на уровне транскрипции, так как фрагменты mHtt влияют на изменение экспрессии некоторых генов кальциевого гомеостаза как в мышинных моделях, так и у пациентов с БХ [6, 88]. Геномные исследования, проведенные на различных моделях БХ, выявили существенные различия в уровнях мРНК генов, кодирующих белки, участвующие во внутриклеточной Ca^{2+} -регуляции, в том числе таких кальцийсвязывающих белков, как парвальбумин, кальмодулин, кальбиндин, гипокальцин; а также рианодиновый рецептор типа 1, рецептор инозитолтрифосфата ($\text{InsP}_3\text{R1}$) и различные субъединицы потенциал-управляемых кальциевых каналов (VGCC) [88–91]. В частности, в мононуклеарных клетках периферической крови при БХ снижен уровень мРНК кальциевого насоса саркоплазматического ретикулума SERCA2 [92].

Недавно с использованием анализа категорий генов выявили ряд генов, кодирующих белки кальциевой сигнализации, экспрессия которых нарушена в нейронах, дифференцированных из HDiPSC [73].

Нарушения транскрипции могут дополнительно усиливаться благодаря кальций-зависимым механизмам контроля. Это может проявляться в резуль-

тате нарушений в кальций-зависимой регуляции активности и стабильности факторов транскрипции, а также изменения функций некоторых кальцийсвязывающих белков, например репрессора транскрипции DREAM (downstream responsive element antagonist modulator), который перемещается в ядро в ответ на увеличение $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле [93, 94]; и кофактора LMO4, активность которого индуцируется притоком Ca^{2+} через VGCC [95].

Также при БХ увеличивается активность глутаматных рецепторов, что приводит к значительному притоку кальция через плазматическую мембрану (ПМ) в цитозоль, нейрональным нарушениям и клеточной гибели. Обнаружена связь между полиглутаминовой экспансией и чувствительностью нейронов к опосредованной глутаматом эксайтотоксичности [96]. Увеличение входа кальция в цитозоль через рецепторы NMDA (NMDAR) обусловлено потенцирующим влиянием mHtt на транспорт и встраивание NMDAR в ПМ [97]. При этом различия в уровнях экспрессии и субъединичном составе NMDAR в разных клетках могут быть одной из причин, объясняющих селективную гибель MSN при БХ [98]. Фармакологическое ингибирование NMDAR оказывало нейропротекторное действие на первичную культуру мышинных MSN, моделирующих БХ [99, 100]. Необходимо также отметить, что мыши YAC128 отличались повышенной экспрессией внесинаптического NMDAR, что приводило к нарушению сигнальных путей p38 MAPK и CREB, дисфункции и атрофии стриатума [101].

Показано также, что mHtt влияет на VGCC, связываясь непосредственно с вспомогательной $\alpha 2/\delta$ -субъединицей VGCC [102]. Ассоциация N-концевого домена хантингина (как мутантного, так и нормального) с каналобразующей $\text{CaV}2.2$ -субъединицей VGCC N-типа приводит к замещению синтаксина 1A, осуществляющего негативную регуляцию канала, и, как следствие, к увеличению активности VGCC N-типа [103]. Этот пример указывает на возможные физиологические функции отщепления N-концевого фрагмента от нормального хантингина, тогда как для понимания роли VGCC N-типа в патологии необходимы дальнейшие исследования. В то же время возможную гиперфункцию VGCC при БХ подтверждают полученные на *Drosophila* результаты, показывающие, что удаление Dmca1D (белка, образующего у дрозофил пору VGCC L-типа) приводит к снижению нейродегенерации фоторецептора [104].

Сверхэкспрессия фрагментов mHtt в клетках-предшественниках нейронов стриатума (Q7/7) приводит к значительному снижению $[\text{Ca}^{2+}]$ в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), в то время как $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле оставалась такой же, как в контроле [105].

Апликация циклопиазоновой кислоты индуцировала повышение выброса Ca^{2+} из ЭР в цитозоль в линии клеток стриатума, полученной из knock-in мышечных эмбрионов, экспрессирующих mHtt с 111Q [106]. В то же время экспрессия mHtt в клетках PC-12 не приводила к статистически значимым изменениям в содержании кальция в ЭР [91].

Показано, что mHtt (но не Htt дикого типа) непосредственно взаимодействует с C-концевой частью $\text{InsP}_3\text{R1}$, увеличивая его чувствительность к InsP_3 [107], тем самым способствуя оттоку Ca^{2+} из ЭР. Важная роль $\text{InsP}_3\text{R1}$ в нейротоксичности, вызванной полиглутаминовой экспансией, подтверждена экспериментально на первичной культуре MSN мышцей, моделирующих БХ [99, 102], а также на *D. melanogaster* [108]. Установлено также, что пептид, дестабилизирующий взаимодействие между mHtt и $\text{InsP}_3\text{R1}$, оказывает нейропротекторное действие на клетки MSN, моделирующие БХ [109]. Кроме того, подавление экспрессии гена InsP_3R уменьшает агрегацию mHtt [110], что подчеркивает важность взаимодействия двух белков в патогенезе БХ.

mHtt, взаимодействуя с $\text{InsP}_3\text{R1}$ и влияя тем самым на содержание Ca^{2+} в ЭР, может нарушать функции SOC (Store-Operated Calcium) каналов. Активация этих каналов происходит в ответ на понижение концентрации кальция во внутриклеточных кальциевых депо, наиболее общим из которых является ЭР. Таким образом, результатом активации $\text{InsP}_3\text{R1}$ будет не только опустошение депо, но и последующий депо-управляемый вход кальция через ПМ. При этом важно отметить, что нарушение SOCE (SOC Entry) обнаружено при многих нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, спиноцеребеллярную атаксию и БХ [80, 111–113].

Нарушение SOCE может быть обусловлено изменением уровня белков STIM1/2, содержащих домены типа EF-hand и выполняющих функции сенсоров кальция в просвете ЭР. Такие изменения могут быть вызваны нарушениями протеасомной деградации, которые наблюдаются при нейродегенерации [114].

Значительное увеличение SOCE обнаружено в клетках нейробластомы SK-N-SH, экспрессирующих mHtt138Q [113]. Предположили, что значительное повышение SOCE в клетках, моделирующих БХ, опосредовано не изменением свойств каналов SOC, а увеличением их количества, однако, следует отметить, что прямые экспериментальные доказательства этой гипотезы в дальнейшем не были представлены.

В клетках SK-N-SH, экспрессирующих не полно-размерный mHtt, но его N-концевой фрагмент, также наблюдалось значительное повышение SOCE.

Дополнительно было показано, что для активации SOCE необходим белок STIM1. В условиях супрессии STIM1 происходило снижение SOCE, причем регистрируемые токи можно было разделить на два типа: с высоким и низким потенциалом реверсии, что предполагает конкуренцию за взаимодействие со STIM1 SOC-каналов минимум двух типов [115]. Данные о том, что не менее двух различных белков опосредуют вход кальция по депо-управляемому механизму, также получены на моделях БХ – клетках нейробластомы мышши Neuro-2a и на первичной культуре нейронов стриатума мышши [16]. Используя методы локальной фиксации потенциала и РНК-интерференции, установили, что каналобразующие белки Orai1 и TRPC1 совместно поддерживают SOCE в клетках, экспрессирующих N-концевой фрагмент mHtt со 138Q, что может объясняться существованием гетеромерного канала, содержащего субъединицы Orai1 и TRPC1 [16]. Предположения о существовании такого гетеромерного канала высказывались еще в 2007 [116], однако в дальнейшем экспериментальных данных, подтверждающих этот тезис, опубликовано не было. В то же время показано, что вход кальция через каналы, образованные Orai1, необходим для встраивания белков TRPC1 в ПМ [117]. Таким образом, можно предположить, что основной вклад в амплитуду депо-управляемых токов в клетках Neuro-2a, моделирующих БХ, вносят белки TRPC1, что подтверждается драматическим падением тока в условиях супрессии TRPC1. Однако в условиях супрессии Orai1 также наблюдалось значительное снижение амплитуды SOCE, что теперь можно объяснить не только уменьшением тока через Orai1, но и снижением TRPC1-опосредованной компоненты тока вследствие нарушения трафика TRPC1 на плазматическую мембрану [16]. Важность TRPC1 в патогенезе БХ подтверждают результаты, согласно которым супрессия TRPC1 с помощью короткой интерферирующей РНК оказывает значительный протекторный эффект на MSN мышцей YAC128 в модели апоптоза, индуцированного глутаматом. При этом супрессия TRPC1 в нейронах мышши дикого типа практически не влияла на гибель клеток, опосредованную глутаматом [111].

Экспрессия N-концевого фрагмента mHtt в первичной культуре MSN также приводит к аномально большому депо-управляемому входу кальция в цитозоль [16]. Эти результаты подтверждаются измерениями внутриклеточной концентрации кальция с помощью кальциевого зонда FURA-2 в клетках MSN, выделенных из мышши YAC128 [111]. Более того, изучено действие на данные клетки соединения EVP4593 – блокатора сигнального пути NF- κ B [111]. Известна тесная связь между активацией NF- κ B

и депо-управляемым входом кальция [118, 119]. NF- κ B способен связываться с геном *Htt* и усиливать активность его промотора в нейронах стриатума мыши [24]. mHtt также может связываться с одним из ключевых ферментов сигнального пути NF- κ B, ИКК, увеличивая тем самым его активность [120].

Показано, что соединение EVP4593 обратимо снижает аномально большой SOCE до контрольных значений как в SK-N-SH, экспрессирующих mHtt с 138Q, так и в MSN мышей YAC128 [111]. Аналогичный эффект EVP4593 оказывал на клетки MSN, экспрессирующие N-концевой фрагмент mHtt [16]. В настоящее время можно считать доказанным, что соединение EVP4593 действует как блокатор SOCE, необходимого для начальных этапов активации сигнальных путей NF- κ B, однако поиски молекулярной мишени EVP4593 продолжаются до сих пор.

Следует отметить, что EVP4593 обладает высоким терапевтическим потенциалом, поскольку оказывает нейропротекторный эффект при индуцированном глутаматом апоптозе MSN из мышей YAC128 и вызывает положительный эффект в тестах на моторику на *D. melanogaster*, моделях БХ [111]. Как показали цитофлуориметрические измерения, инкубация клеток Neuro-2a, моделирующих БХ, с EVP4593 приводила к повышению выживаемости этих клеток [16].

На основе опубликованных данных можно предположить, что нейропротекторный эффект EVP4593 обусловлен существованием отрицательной обратной связи в цепочке воздействия mHtt на клетку. Поскольку NF- κ B способен связываться непосредственно с *Htt* и усиливать активность его промотора [24], а EVP4593 блокирует проведение сигнала NF- κ B, возможным результатом аппликации EVP4593 может стать снижение экспрессии mHtt и, как следствие, уменьшение его токсических функций. Тем не менее, для подтверждения подобного предположения требуются дополнительные исследования.

Особый интерес представляет изучение влияния экспрессии mHtt на SOCE, выполненное на БХ-специфичных нейронах человека, дифференцированных из iPSC и экспрессирующих mHtt с низким количеством Q в тракте. Несмотря на то что полиглутаминовый тракт mHtt в этой модели заболевания содержал всего 40–47Q, что находится на границе с нормой, изменения в SOCE оказались столь же существенными, как и в других моделях, где длина тракта превышала 100Q [73]. При этом соединение EVP4593 снижало амплитуду SOCE как при патологии, так и в контроле, а также оказывало нейропротекторный эффект при воздействии ингибитора протеасом MG132 [73].

В целом, проведенные исследования показывают, что нарушения SOCE носят систематический ха-

рактер и наблюдаются в различных клеточных моделях БХ (рис. 5) [16, 73, 111]. Данный факт может говорить о том, что нарушения SOCE предшествуют, по-видимому, иным патологическим процессам, происходящим при БХ и, возможно, являются одним из центральных механизмов, лежащих в основе нейродегенерации. Таким образом, SOCE можно считать перспективной мишенью для разработки подходов к терапии БХ, а полученные на различных клеточных моделях данные позволяют надеяться на создание лекарственного средства на основе соединения EVP4593.

Предполагается, что увеличение SOCE влияет непосредственно на способность митохондрий запасать Ca^{2+} , так как митохондрии находятся в непосредственной близости от области выброса Ca^{2+} из ЭР [121]. Митохондрия является одним из главных регуляторов внутриклеточного уровня Ca^{2+} . При значительном увеличении $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле в непосредственной близости от митохондрии происходит активация низкоаффинного митохондриального Ca^{2+} -унипортера (MCU), опосредуя приток Ca^{2+} в матрикс. Митохондрии высвобождают Ca^{2+} с помощью $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника [122] или, в случае перегрузки кальцием, через мегапоры (PTP), активация которых приводит к скачку мембранного потенциала, разрыву наружной мембраны и высвобождению цитохрома c и каспаз, следствием чего является апоптотическая гибель клетки [123, 124]. Вовлеченность митохондриальной дисфункции в патогенез БХ подтверждается, в частности, тем, что 3-нитропропионовая кислота, используемая в качестве ингибитора комплекса II дыхательной цепи митохондрий, вызывает нарушения, характерные для БХ [125]. Еще одно доказательство важной роли митохондрий в патогенезе БХ – нейропротекторный эффект ингибиторов проницаемости митохондриальной мембраны, показанный как на клеточных, так и на животных моделях [99, 126].

При экспрессии mHtt обнаружены также дефекты митохондриальной морфологии. В клеточной линии, полученной из knock-in мышинных эмбрионов, экспрессирующих mHtt с 111Q, митохондрии более склонны к фрагментации по причине того, что нарушение $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле способствует усилению активности кальций-зависимой фосфатазы – кальцинейрина, дефосфорилирующей (и таким образом активирующей) белок Drp1, ответственный за деление митохондрий. В конечном счете, усиленная фрагментация митохондрий увеличивает склонность клеток к апоптозу [106].

Нарушения забуферивания Ca^{2+} и кальциевого обмена в митохондриях зарегистрированы как на ранних, так и на поздних стадиях БХ, что ука-

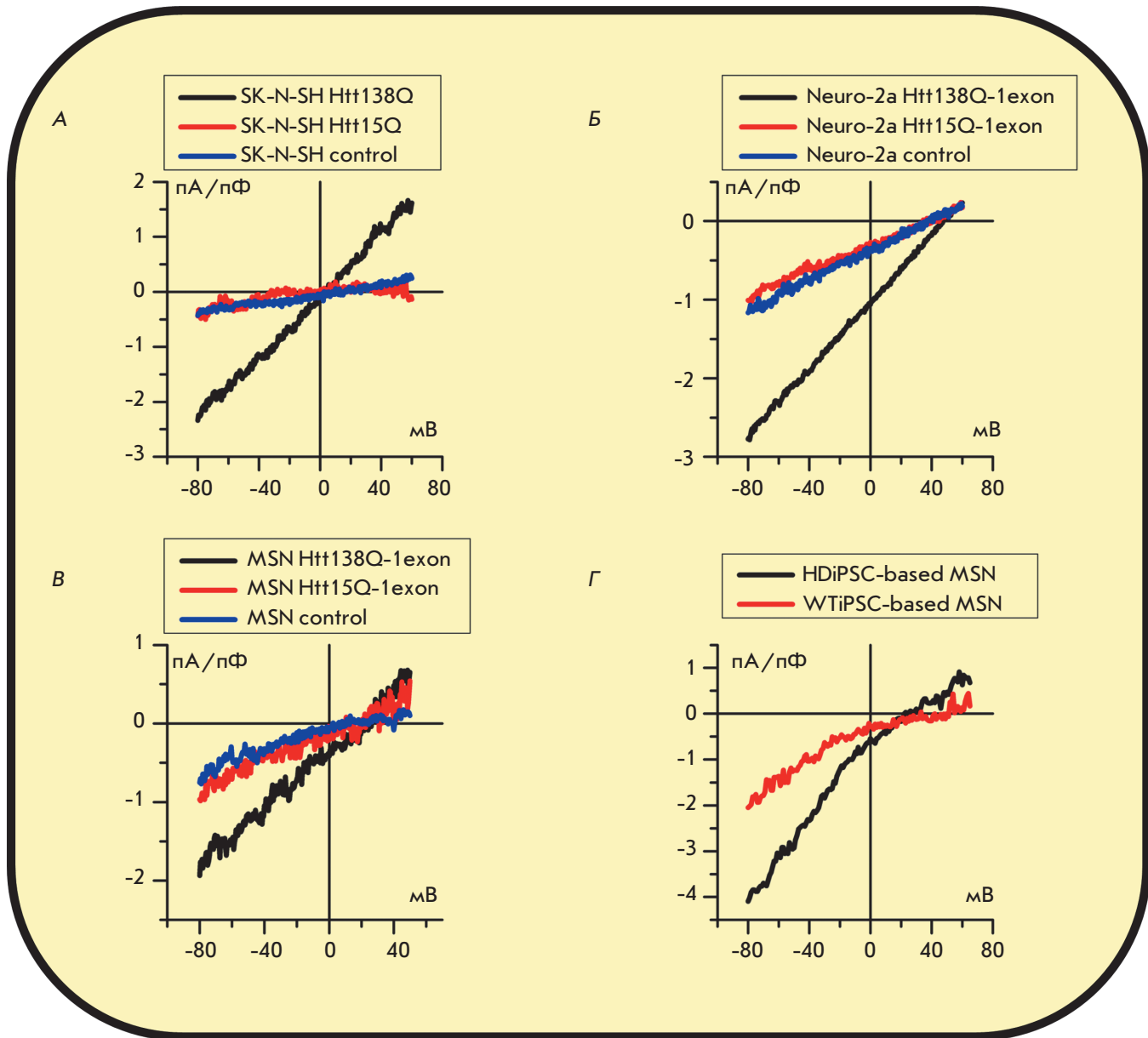


Рис. 5. Патологическое увеличение депо-управляемого входа кальция в различных клеточных моделях болезни Хантингтона. Средние вольт-амперные характеристики депо-управляемых токов, нормированных на емкость клеток на максимуме их развития: *А* – в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, экспрессирующих полноразмерный хантингтин 138Q, 15Q или пустой контрольный вектор [111]; *Б* – в клетках нейробластомы мыши Neuro-2a, экспрессирующих первый экзон хантингтина, содержащий 138Q, 15Q или пустой контрольный вектор [16]; *В* – в клетках первичной культуры нейронов стриатума мыши MSN, экспрессирующих первый экзон хантингтина, содержащий 138Q, 15Q или пустой контрольный вектор [16]; *Г* – в нейронах человека, дифференцированных из Хантингтон-специфичных iPSC или из iPSC дикого типа [73]

зывает на ключевую роль этих нарушений в патогенезе заболевания. Митохондрии, выделенные из клеток мозга пациентов с БХ и из клеток мышей, моделирующих БХ, более чувствительны к нагрузке Ca^{2+} и склонны к образованию мегаспор [127, 128]. Аналогичные результаты получены позднее на им-

мортализованной линии клеток-предшественников нейронов стриатума, полученной из knock-in мышей KI-Hdh^{Q111} [129]. Тем не менее, восприимчивость митохондрий к кальциевой нагрузке воспроизводилась не во всех экспериментальных моделях. Например, стриатальные митохондрии, полученные из knock-

in мышей, экспрессирующих различные варианты mHtt (80, 92 или 111Q), из мышей R6/2, а также из мышей YAC128 были одинаково, а в некоторых случаях даже менее восприимчивы к Ca^{2+} -нагрузке, чем контрольные образцы дикого типа [130, 131]. Кроме того, чувствительность митохондрий к Ca^{2+} -нагрузке в некоторых моделях БХ снижалась пропорционально возрасту и длине polyQ-тракта [130], что предполагает наличие защитных компенсаторных механизмов. Недавно проведенное изучение изолированных митохондрий и стриатальных нейронов мышей R6/2 также выявило отсутствие дисфункции дыхательной цепи и повышенной чувствительности митохондрий к кальциевой нагрузке [132]. Таким образом, роль митохондрий в патогенезе БХ остается дискуссионной, и необходимы дальнейшие исследования, направленные на выяснение молекулярных механизмов заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на длительную историю изучения БХ, проблемы манифестации, моделирования и изучения молекулярных основ заболевания остаются актуальными. В данном обзоре рассмотрены клеточные и животные модели, широко используемые при изучении патологических процессов при БХ, а также для скрининга потенциальных лекарственных средств. Особый интерес представляют модели, основанные на эндогенной экспрессии мутантно-

го хантингтина в нейронах, дифференцированных из пациент-специфичных iPSC. Анализ современных публикаций позволяет сделать вывод о том, что нарушения кальциевой сигнализации являются одним из центральных звеньев, опосредующих развитие патологии и приводящих к гибели нейронов. Один из важнейших сегментов кальциевой сигнализации, нарушенный при БХ, – депо-управляемый вход кальция, патологическое увеличение которого показано на многих упомянутых в обзоре моделях. Вероятно, нарушение содержания кальция в ЭР вкупе с сопряженным избыточным депо-управляемым входом кальция через ПМ может оказывать влияние на митохондрии, которые начинают активировать процессы клеточной гибели, будучи не в силах депонировать излишки кальция.

Подводя итог, необходимо отметить, что изучение нейродегенерации является интенсивно развивающейся научной областью, что дает надежду на составление полной фундаментальной картины процессов нейродегенерации и разработку новых лекарственных средств, эффективных при таких заболеваниях, как БХ, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и другие патологии. ●

*Работа поддержана грантом РФ
№14-14-00720 (ЕВК), Программой Президиума РАН
«Молекулярная и клеточная биология» (ЮАК),
стипендиями Президента РФ (Вав и АВШ).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Huntington G. // Med. Surg. Rept. Philadelphia. 1872. V. 26. № 15. P. 317–321.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group // Cell. 1993. V. 72. № 6. P. 971–983.
- Vonsattel J.P., DiFiglia M. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1998. V. 57. № 5. P. 369–384.
- Угрюмов М.В. // Вестник РАМН. 2010. № 8. С. 6–19.
- Sarkar A., Irwin M., Singh A., Riccetti M., Singh A. // Neural Regen. Res. 2016. V. 11. № 5. P. 693–697.
- Zuccato C., Valenza M., Cattaneo E. // Physiol. Rev. 2010. V. 90. № 3. P. 905–981.
- Francelle L., Galvan L., Brouillet E. // Front Cell Neurosci. 2014. V. 8. P. 295.
- Plotkin J.L., Surmeier D.J. // Curr. Opin. Neurobiol. 2015. V. 33. P. 53–62.
- Sepers M.D., Raymond L.A. // Drug Discov. Today. 2014. V. 19. № 7. P. 990–996.
- Margulis J., Finkbeiner S. // Front Cell Neurosci. 2014. V. 8. P. 218.
- Hinckelmann M., Zala D., Saudou F. // Trends Cell Biol. 2013. V. 23. № 12. P. 634–643.
- Panov A.V., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., Hayden M.R., Burke J.R., Strittmatter W.J., Greenamyre J.T. // Nat. Neurosci. 2002. V. 5. № 8. P. 731–736.
- Costa V., Scorrano L. // EMBO J. 2012. V. 31. № 8. P. 1853–1864.
- Reddy P.H., Shirendeb U.P. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1822. № 2. P. 101–110.
- Giacomello M., Oliveros J.C., Naranjo J.R., Carafoli E. // Prion. 2013. V. 7. № 1. P. 76–84.
- Vigont V., Kolobkova Y., Skopin A., Zimina O., Zenin V., Glushankova L., Kaznacheyeva E. // Front. Physiol. 2015. V. 6. P. 337.
- Wu J., Ryskamp D.A., Liang X., Egorova P., Zakharova O., Hung G., Bezprozvanny I. // J. Neurosci. 2016. V. 36. № 1. P. 125–141.
- Walker F.O. // Lancet. 2007. V. 369. № 9557. P. 218–228.
- Andrew S., Theilmann J., Almqvist E., Norremolle A., Lucotte G., Anvret M., Sorensen S.A., Turpin J.C., Hayden M.R. // Clin. Genet. 1993. V. 43. № 6. P. 286–294.
- Langbehn D.R., Brinkman R.R., Falush D., Paulsen J.S., Hayden M.R., International Huntington's Disease Collaborative Group. // Clin. Genet. 2004. V. 65. № 4. P. 267–277.
- Brinkman R.R., Mezei M.M., Theilmann J., Almqvist E., Hayden M.R. // Am. J. Hum. Genet. 1997. V. 60. № 5. P. 1202–1210.
- Nazé P., Vuillaume I., Destée A., Pasquier F., Sablonnière B. // Neurosci. Lett. 2002. V. 328. № 1. P. 1–4.
- Metzger S., Rong J., Nguyen H.P., Cape A., Tomiuk J., Soehn A.S., Propping P., Freudenberg-Hua Y., Freudenberg J., Tong L., et al. // Hum. Mol. Genet. 2008. V. 17. № 8. P. 1137–1146.
- Bečanović K., Norremolle A., Neal S.J., Kay C., Collins J.A.,

- Arenillas D., Lilja T., Gaudenzi G., Manoharan S., Doty C.N., et al. // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. № 6. P. 807–816.
25. Wild E.J., Boggio R., Langbehn D., Robertson N., Haider S., Miller J.R., Zetterberg H., Leavitt B.R., Kuhn R., Tabrizi S.J., et al. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 5. P. 1979–1986.
26. Hu Y., Chopra V., Chopra R., Locascio J.J., Liao Z., Ding H., Zheng B., Matson W.R., Ferrante R.J., Rosas H.D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 41. P. 17141–17146.
27. Mastrokoulas A., Ariyurek Y., Goeman J.J., van Duijn E., Roos R.A., van der Mast R.C., van Ommen G.B., den Dunnen J.T., 't Hoen P.A., van Roon-Mom W.M. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2015. V. 23. № 10. P. 1349–1356.
28. Aziz N.A., Anguelova G.V., Marinus J., Lammers G.J., Roos R.A. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2010. V. 16. № 5. P. 345–350.
29. Mesko B., Poliska S., Szegedi A., Szekanez Z., Palatka K., Papp M., Nagy L. // *BMC Med. Genomics.* 2010. V. 3. P. 15.
30. Demougeot C., Garnier P., Mossiat C., Bertrand N., Giroud M., Beley A., Marie C. // *J. Neurochem.* 2001. V. 77. № 2. P. 408–415.
31. Sturrock M., Hao W., Schwartzbaum J., Rempala G.A. // *J. Theor. Biol.* 2015. V. 380. P. 299–308.
32. Wood N.I., Goodman A.O., van der Burg J.M., Gazeau V., Brundin P., Björkqvist M., Petersén A., Tabrizi S.J., Barker R.A., Morton A.J. // *Brain Res. Bull.* 2008. V. 76. № 1–2. P. 70–79.
33. Weir D.W., Sturrock A., Leavitt B.R. // *Lancet Neurol.* 2011. V. 10. № 6. P. 573–590.
34. Chen C.M., Wu Y.R., Cheng M.L., Liu J.L., Lee Y.M., Lee P.W., Soong B.W., Chiu D.T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 359. № 2. P. 335–340.
35. Dalrymple A., Wild E.J., Joubert R., Sathasivam K., Björkqvist M., Petersén A., Jackson G.S., Isaacs J.D., Kristiansen M., Bates G.P., et al. // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. № 7. P. 2833–2840.
36. Ehrnhöfer D.E., Sutton L., Hayden M.R. // *Neuroscientist.* 2011. V. 17. № 5. P. 475–492.
37. Harjes P., Wanker E.E. // *Trends Biochem. Sci.* 2003. V. 28. P. 425–433.
38. Warby S.C., Doty C.N., Graham R.K., Carroll J.B., Yang Y.Z., Singaraja R.R., Overall C.M., Hayden M.R. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 15. P. 2390–2404.
39. Kim M.W., Chelliah Y., Kim S.W., Otwinowski Z., Bezprozvanny I. // *Structure.* 2009. V. 17. № 9. P. 1205–1212.
40. Michalek M., Salnikow E.S., Bechinger B. // *Biophys. J.* 2013. V. 105. № 3. P. 699–710.
41. Vijayvargia R., Epan R., Leitner A., Jung T.Y., Shin B., Jung R., Lloret A., Singh Atwal R., Lee H., Lee J.M., et al. // *Elife.* 2016. pii: e11184.
42. DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O., Davies S.W., Bates G.P., Vonsattel J.P., Aronin N. // *Science.* 1997. V. 277. № 5334. P. 1990–1993.
43. Davies S.W., Turmaine M., Cozens B.A., DiFiglia M., Sharp A.H., Ross C.A., Scherzinger E., Wanker E.E., Mangiarini L., Bates G.P. // *Cell.* 1997. V. 90. № 3. P. 537–548.
44. Rockabrand E., Slepko N., Pantalone A., Nukala V.N., Kazantsev A., Marsh J.L., Sullivan P.G., Steffan J.S., Sensi S.L., Thompson L.M. // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. № 1. P. 61–77.
45. Sadri-Vakili G., Cha J.H. // *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2006. V. 2. № 6. P. 330–338.
46. Gutekunst C.A., Li S.H., Yi H., Mulroy J.S., Kuemmerle S., Jones R., Rye D., Ferrante R.J., Hersch S.M., Li X.J. // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. № 7. P. 2522–2534.
47. Juenemann K., Weisse C., Reichmann D., Kaether C., Calkhoven C.F., Schilling G. // *Neurotox. Res.* 2011. V. 20. № 2. P. 120–133.
48. Saudou F., Finkbeiner S., Devys D., Greenberg M.E. // *Cell.* 1998. V. 95. № 1. P. 55–66.
49. Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E.S., Segal M.R., Finkbeiner S. // *Nature.* 2004. V. 431. № 7010. P. 805–810.
50. Stefani M. // *Prog. Neurobiol.* 2012. V. 99. № 3. P. 226–245.
51. Carter R.J., Lione L.A., Humby T., Mangiarini L., Mahal A., Bates G.P., Dunnett S.B., Morton A.J. // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. № 8. P. 3248–3257.
52. Li H., Li S.H., Cheng A.L., Mangiarini L., Bates G.P., Li X.J. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. № 7. P. 1227–1236.
53. Menalled L.B., Chesselet M.F. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2002. V. 23. № 1. P. 32–39.
54. Woodman B., Butler R., Landles C., Lupton M.K., Tse J., Hockley E., Moffitt H., Sathasivam K., Bates G.P. // *Brain Res. Bull.* 2007. V. 72. № 2–3. P. 83–97.
55. Li X.J., Li S. // *J. Genet. Genomics.* 2012. V. 39. № 6. P. 239–245.
56. Li Z., Karlovich C.A., Fish M.P., Scott M.P., Myers R.M. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. № 9. P. 1807–1815.
57. Marsh J.L., Walker H., Theisen H., Zhu Y.Z., Fielder T., Purcell J., Thompson L.M. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 1. P. 13–25.
58. Kahsai L., Zars T. // *Int. Rev. Neurobiol.* 2011. V. 99. P. 139–167.
59. Morley J.F., Brignull H.R., Weyers J.J., Morimoto R.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 16. P. 10417–10422.
60. Parker J.A., Connolly J.B., Wellington C., Hayden M., Dausset J., Neri C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 23. P. 13318–13323.
61. Giorgini F., Guidetti P., Nguyen Q., Bennett S.C., Muchowski P.J. // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. № 5. P. 526–531.
62. Kochneva-Pervukhova N.V., Alexandrov A.I., Ter-Avanesyan M.D. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 1. e29832.
63. Duennwald M.L., Lindquist S. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 23. P. 3308–3319.
64. Colle D., Hartwig J.M., Soares F.A., Farina M. // *Brain Res. Bull.* 2012. V. 87. № 4–5. P. 397–405.
65. Smith D.L., Portier R., Woodman B., Hockley E., Mahal A., Klunk W.E., Li X.J., Wanker E., Murray K.D., Bates G.P. // *Neurobiol. Dis.* 2001. V. 8. № 6. P. 1017–1026.
66. Li S.H., Cheng A.L., Li H., Li X.J. // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. № 13. P. 5159–5172.
67. Sarantos M.R., Papanikolaou T., Ellerby L.M., Hughes R.E. // *J. Huntingtons Dis.* 2012. V. 1. № 2. P. 195–210.
68. Milnerwood A.J., Kaufman A.M., Sepers M.D., Gladding C.M., Zhang L., Wang L., Fan J., Coquinco A., Qiao J.Y., Lee H., et al. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 48. № 1. P. 40–51.
69. Doria J.G., Silva F.R., de Souza J.M., Vieira L.B., Carvalho T.G., Reis H.J., Pereira G.S., Dobransky T., Ribeiro F.M. // *Br. J. Pharmacol.* 2013. V. 169. № 4. P. 909–921.
70. Reinhart P.H., Kaltenbach L.S., Essrich C., Dunn D.E., Eudailey J.A., DeMarco C.T., Turmel G.J., Whaley J.C., Wood A., Cho S., et al. // *Neurobiol. Dis.* 2011. V. 43. № 1. P. 248–256.
71. Ebert A.D., Shelley B.C., Hurley A.M., Onorati M., Castiglioni V., Patitucci T.N., Svendsen S.P., Mattis V.B., McGivern J.V., Schwab A.J., et al. // *Stem Cell Res.* 2013. V. 10. № 3. P. 417–427.
72. Carri A.D., Onorati M., Lelos M.J., Castiglioni V., Faedo A., Menon R., Camnasio S., Vuono R., Spaiardi P., Talpo F., et al. // *Development.* 2013. V. 140. № 2. P. 301–312.
73. Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., Lebedeva O.S., Vassina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Semashko T.A., Kiseleva E., Suldina L.A., et al. // *Mol. Neurodegener.* 2016. V. 11. P. 27. doi: 10.1186/s13024-016-0092-5.
74. HD iPSC Consortium. // *Cell Stem Cell.* 2012. V. 11. № 2. P. 264–278.

75. Camnasio S., Delli Carri A., Lombardo A., Grad I., Mariotti C., Castucci A., Rozell B., Lo Riso P., Castiglioni V., Zuccato C., et al. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 46. № 1. P. 41–51.
76. Guo X., Disatnik M.H., Monbureau M., Shamloo M., Mochly-Rosen D., Qi X. // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. № 12. P. 5371–5388.
77. Charbord J., Poydenot P., Bonnefond C., Feyeux M., Casagrande F., Brinon B., Francelle L., Auregan G., Guillemier M., Caillere M., et al. // *Stem Cells.* 2013. V. 31. № 9. P. 1816–1828.
78. Jeon I., Lee N., Li J.Y., Park I.H., Park K.S., Moon J., Shim S.H., Choi C., Chang D.J., Kwon J., et al. // *Stem Cells.* 2012. V. 30. № 9. P. 2054–2062.
79. Bezprozvanny I. // *Trends Mol. Med.* 2009. V. 15. № 3. P. 89–100.
80. Ryazantseva M., Skobeleva K., Glushankova L., Kaznacheeva E. // *J. Neurochem.* 2016. V. 136. № 5. P. 1085–1095.
81. Abeti R., Abramov A.Y. // *Pharmacol. Res.* 2015. V. 99. P. 377–381.
82. Saris N.E., Carafoli E. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2005. V. 70. № 2. P. 187–194.
83. Naranjo J.R., Mellström B. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 38. P. 31674–31680.
84. Bao J., Sharp A.H., Wagster M.V., Becher M., Schilling G., Ross C.A., Dawson V.L., Dawson T.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 10. P. 5037–5042.
85. Kreutz M.R., Naranjo J.R., Koch K.W., Schwaller B. // *Front. Mol. Neurosci.* 2012. V. 5. P. 92.
86. Dudek N.L., Dai Y., Muma N.A. // *Brain Pathol.* 2010. V. 20. № 1. P. 176–189.
87. Menzies F.M., Garcia-Arencibia M., Imarisio S., O’Sullivan N.C., Ricketts T., Kent B.A., Rao M.V., Lam W., Green-Thompson Z.W., Nixon R.A., et al. // *Cell Death Differ.* 2015. V. 22. № 3. P. 433–444.
88. Luthi-Carter R., Hanson S.A., Strand A.D., Bergstrom D.A., Chun W., Peters N.L., Woods A.M., Chan E.Y., Kooperberg C., Krainc D., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. № 17. P. 1911–1926.
89. Hodges A., Strand A.D., Aragaki A.K., Kuhn A., Sengstag T., Hughes G., Elliston L.A., Hartog C., Goldstein D.R., Thu D., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. № 6. P. 965–977.
90. Kuhn A., Goldstein D.R., Hodges A., Strand A.D., Sengstag T., Kooperberg C., Becanovic K., Pouladi M.A., Sathasivam K., Cha J.H., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. № 15. P. 1845–1861.
91. Czeredys M., Gruszczynska-Biegala J., Schacht T., Methner A., Kuznicki J. // *Front. Mol. Neurosci.* 2013. V. 6. P. 42.
92. Cesca F., Bregant E., Peterlin B., Zadel M., Dubsky de Wittenau G., Siciliano G., Ceravolo R., Petrozzi L., Pualetto G., Verriello L., et al. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 4. e0125259.
93. Ledo F., Kremer L., Mellström B., Naranjo J.R. // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 17. P. 4583–4592.
94. Savignac M., Pintado B., Gutierrez-Adan A., Palczewska M., Mellström B., Naranjo J.R. // *EMBO J.* 2005. V. 24. № 20. P. 3555–3564.
95. Kashani A.H., Qiu Z., Jurata L., Lee S.K., Pfaff S., Goebels S., Nave K.A., Ghosh A. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 32. P. 8398–8408.
96. Sun Y., Savanenin A., Reddy P.H., Liu Y.F. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 27. P. 24713–24718.
97. Fan M.M., Fernandes H.B., Zhang L.Y., Hayden M.R., Raymond L.A. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 14. P. 3768–3779.
98. Fan M.M., Raymond L.A. // *Prog. Neurobiol.* 2007. V. 81. № 5–6. P. 272–293.
99. Tang T.S., Slow E., Lupu V., Stavrovskaya I.G., Sugimori M., Llinás R., Kristal B.S., Hayden M.R., Bezprozvanny I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 7. P. 2602–2607.
100. Shehadeh J., Fernandes H.B., Zeron Mullins M.M., Graham R.K., Leavitt B.R., Hayden M.R., Raymond L.A. // *Neurobiol. Dis.* 2006. V. 21. № 2. P. 392–403.
101. Dau A., Gladding C.M., Sepers M.D., Raymond L.A. // *Neurobiol. Dis.* 2014. V. 62. P. 533–542.
102. Kaltenbach L.S., Romero E., Becklin R.R., Chettier R., Bell R., Phansalkar A., Strand A., Torcassi C., Savage J., Hurlburt A., et al. // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. № 5. e82.
103. Swayne L.A., Chen L., Hameed S., Barr W., Charlesworth E., Colicos M.A., Zamponi G.W., Braun J.E. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2005. V. 30. № 3. P. 339–351.
104. Romero E., Cha G.H., Verstreken P., Ly C.V., Hughes R.E., Bellen H.J., Botas J. // *Neuron.* 2008. V. 57. № 1. P. 27–40.
105. De Mario A., Scarlatti C., Costiniti V., Primerano S., Lopreato R., Cali T., Brini M., Giacomello M., Carafoli E. // *PLoS Curr.* 2016. V. 8. doi: 10.1371/currents.hd37fbc1c9a27503dc845594ee4a7316c3.
106. Costa V., Giacomello M., Hudec R., Lopreato R., Ermak G., Lim D., Malorni W., Davies K.J., Carafoli E., Scorrano L. // *EMBO Mol. Med.* 2010. V. 2. № 12. P. 490–503.
107. Tang T.S., Tu H., Chan E.Y., Maximov A., Wang Z., Wellington C.L., Hayden M.R., Bezprozvanny I. // *Neuron.* 2003. V. 39. № 2. P. 227–239.
108. Zhang H., Li Q., Graham R.K., Slow E., Hayden M.R., Bezprozvanny I. // *Neurobiol. Dis.* 2008. V. 31. № 1. P. 80–88.
109. Tang T.S., Guo C., Wang H., Chen X., Bezprozvanny I. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 5. P. 1257–1266.
110. Bauer P.O., Hudec R., Ozaki S., Okuno M., Ebisui E., Mikoshiba K., Nukina N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 416. № 1–2. P. 13–17.
111. Wu J., Shih H., Vigont V., Hrdlicka L., Diggins L., Singh C., Mahoney M., Chesworth R., Shapiro G., Ahlijanian M., et al. // *Chem. Biol.* 2011. V. 18. № 6. P. 777–793.
112. Egorova P., Popugaeva E., Bezprozvanny I. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015. V. 40. P. 127–133.
113. Glushankova L.N., Zimina O.A., Vigont V.A., Mozhaeva G.N., Bezprozvanny I.B., Kaznacheeva E.V. // *Dokl. Biol. Sci.* 2010. V. 433. P. 293–295.
114. Kuang X.L., Liu Y., Chang Y., Zhou J., Zhang H., Li Y., Qu J., Wu S. // *Cell Calcium.* 2016. V. 59. № 4. P. 172–180.
115. Vigont V.A., Zimina O.A., Glushankova L.N., Kolobkova J.A., Ryazantseva M.A., Mozhayeva G.N., Kaznacheeva E.V. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. № 4. P. 40–47.
116. Liao Y., Erxleben C., Yildirim E., Abramowitz J., Armstrong D.L., Birnbaumer L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 11. P. 4682–4687.
117. Cheng K.T., Ong H.L., Liu X., Ambudkar I.S. // *Curr. Top Membr.* 2013. V. 71. P. 149–179.
118. Dolmetsch R.E., Xu K., Lewis R.S. // *Nature.* 1998. V. 392. № 6679. P. 933–936.
119. Chang W.S. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2006. V. 27. № 7. P. 813–820.
120. Khoshnan A., Ko J., Watkin E.E., Paige L.A., Reinhart P.H., Patterson P.H. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 37. P. 7999–8008.
121. Kipanyula M.J., Contreras L., Zampese E., Lazzari C., Wong A.K., Pizzo P., Fasolato C., Pozzan T. // *Aging Cell.* 2012. V. 11. № 5. P. 885–893.
122. Carafoli E. // *Biochem. Soc. Symp.* 1974. № 39. P. 89–109.
123. Giacomello M., Drago I., Pizzo P., Pozzan T. // *Cell Death Differ.* 2007. V. 14. № 7. P. 1267–1274.
124. Giacomello M., Oliveros J.C., Naranjo J.R., Carafoli E. // *Prion.* 2013. V. 7. № 1. P. 76–84.
125. Brouillet E., Jacquard C., Bizat N., Blum D. // *J. Neurochem.* 2005. V. 95. № 6. P. 1521–1540.

126. Wang H., Lim P.J., Karbowski M., Monteiro M.J. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 4. P. 737–752.
127. Panov A.V., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., Hayden M.R., Burke J.R., Strittmatter W.J., Greenamyre J.T. // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 5. № 8. P. 731–736.
128. Choo Y.S., Johnson G.V., MacDonald M., Detloff P.J., Lesort M. // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. № 14. P. 1407–1420.
129. Lim D., Fedrizzi L., Tartari M., Zuccato C., Cattaneo E., Brini M., Carafoli E. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 9. P. 5780–5789.
130. Brustovetsky N., LaFrance R., Purl K.J., Brustovetsky T., Keene C.D., Low W.C., Dubinsky J.M. // *J. Neurochem.* 2005. V. 93. № 6. P. 1361–1370.
131. Oliveira J.M., Jekabsons M.B., Chen S., Lin A., Rego A.C., Gonçalves J., Ellerby L.M., Nicholls D.G. // *J. Neurochem.* 2007. V. 101. № 1. P. 241–249.
132. Hamilton J., Pellman J.J., Brustovetsky T., Harris R.A., Brustovetsky N. // *Hum. Mol. Genet.* 2016. pii: ddw133. (Epub).