

УДК 577.352.465

# Белок STIM1 активирует депо-управляемые кальциевые каналы в клетках-моделях болезни Хантингтона

В. А. Вигонт, О. А. Зимина, Л. Н. Глушанкова, Ю. А. Колобкова, М. А. Рязанцева, Г. Н. Можаяева, Е. В. Казначеева\*

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

\*E-mail: evkzn@incras.ru

Поступила в редакцию 22.05.2014

**РЕФЕРАТ** Ранее нами было показано, что экспрессия полноразмерного мутантного хантингтина в клетках нейробластомы человека (SK-N-SH) приводит к аномальному увеличению входа кальция через депо-управляемые каналы. В данной работе показано, что для получения адекватной модели болезни Хантингтона достаточно экспрессии N-концевого фрагмента мутантного хантингтина (Htt138Q-1exon). Установлено, что экспрессия Htt138Q-1exon вызывает значительное увеличение депо-управляемого кальциевого входа в клетках SK-N-SH, причем для этого необходим белок STIM1, являющийся сенсором кальция в просвете эндоплазматического ретикулума. Показано также, что депо-управляемый вход кальция в клетках, экспрессирующих Htt138Q-1exon, опосредуется, по меньшей мере, двумя типами каналов с различными потенциалами реверсии. Полученные результаты позволяют рассматривать белки, отвечающие за активацию и поддержание депо-управляемого входа кальция, в качестве новых перспективных мишеней в терапии нейродегенеративных заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** болезнь Хантингтона, кальций, нейродегенерация, SOC, STIM1.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БХ – болезнь Хантингтона; ВАХ – вольт-амперная характеристика; ПМ – плазматическая мембрана; ЭР – эндоплазматический ретикулум; Htt138Q-1exon – продукт, кодируемый первым экзоном мутантного белка хантингтина, или клетки, экспрессирующие этот продукт; Htt138Q-1exon STIM1(-) – клетки Htt138Q-1exon с подавленной экспрессией белка STIM1; IP<sub>3</sub> – инозитол-1,4,5-трисфосфат; IP<sub>3</sub>R1 – рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата 1; GFP – зеленый флуоресцентный белок; SK-N-SH – клетки нейробластомы человека; STIM1 – стромальная взаимодействующая молекула 1 (STromal Interaction Molecule 1).

## ВВЕДЕНИЕ

Нарушения кальциевой сигнализации наблюдаются при многих заболеваниях, в частности, дестабилизация работы кальциевых ионных каналов различного типа связана с такими патологиями, как, например, сахарный диабет [1] или боковой амиотрофический склероз [2]. Во многих публикациях отмечается вовлеченность нарушенной кальциевой сигнализации в процессы нейродегенерации [3, 4].

Болезнь Хантингтона (БХ) – аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, обусловленное увеличением числа кодирующих глутамин повторов в первом экзоне гена белка хантингтина. В норме длина полиглутаминового повтора не должна превышать 35 остатков, в то время как при заболевании длина таких повторов достигает 90 и более

остатков глутамина [5]. В первую очередь, при БХ поражаются нейроны стриатума.

В клетке хантингтин выполняет функции адаптерного белка, т.е. обеспечивает колокализацию взаимодействующих с ним белков, помогая им выполнять свои функции. С хантингтином взаимодействует множество белков с самыми разнообразными функциями – от везикулярного транспорта и эндоцитоза до регуляции транскрипции и апоптоза [6].

Одна из токсических функций мутантного хантингтина – дестабилизация кальциевой сигнализации. Ранее было показано, что мутантный хантингтин способен прямо связываться с C-концом рецептора инозитол-1,4,5-трисфосфата первого типа (IP<sub>3</sub>R1). Такое связывание увеличивает чувствительность IP<sub>3</sub>R1 к своему лиганду, что может приводить к активации рецептора и опустошению внутриклеточных

кальциевых депо в ответ на базальные концентрации  $IP_3$  в цитозоле [7]. Показано также, что экспрессия мутантного хантингина вызывает усиление функции NR2B-содержащего рецептора NMDA [8] и воздействует на потенциал-зависимые кальциевые каналы [9]. Все перечисленные пути ведут к повышению концентрации ионов кальция в цитозоле и, как следствие, к аномальному накоплению кальция в митохондриях [10, 11], активации кальпаинов [12], патологическому запуску кальций-зависимых сигнальных путей, апоптотической активности и дегенерации нейронов.

Ранее мы наблюдали аномальную активацию депо-управляемых кальциевых каналов в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, в которых для моделирования БХ экспрессировали полноразмерный мутантный белок хантингин [13]. Помимо этого мы показали, что депо-управляемый вход кальция может рассматриваться как потенциальная мишень для терапевтического воздействия при разработке новых подходов к терапии БХ. Также флуоресцентными методами было показано, что депо-управляемый вход кальция гиперактивирован в нейронах стриатума, выделенных из мышей YAC128, используемых в качестве модели БХ [14].

Считается, что БХ ассоциирована с отщеплением от мутантного хантингина N-концевого фрагмента, который кодируется первым экзоном и содержит полиглутаминовый тракт. Этот процесс сопровождается накоплением отщепленного фрагмента в ядре, в то время как хантингин дикого типа локализован в основном в цитозоле [15, 16]. Показано также, что для увеличения чувствительности  $IP_3R1$  к  $IP_3$  достаточно экспрессии лишь N-концевого фрагмента патогенного хантингина [7].

В связи с этим целью нашей работы стало изучение изменений работы депо-управляемых кальциевых каналов в клетках SK-N-SH, экспрессирующих первый экзон гена патологического хантингина со 138 остатками глутамина в тракте (Htt138Q-1exon), а также исследование роли белка STIM1 в активации этих каналов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клетки

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

### Инфицирование клеток, трансфекция и РНК-интерференция

Челночный вектор, кодирующий N-концевой фрагмент белка Htt138Q-1exon (270 аминокислот), конъюгированный с HA-tag, пакующий вектор HIV-1 8.9 и VSVG плазмиды, кодирующие поверхностные гликопротеины вирусной частицы, были любезно предоставлены проф. И.Б. Безпрозванным (UT Southwestern Medical Center, США). Вирус Lenti-Htt138Q-1exon создан путем котрансфекции челночного вектора с пакующим вектором HIV-1 8.9 ( $\Delta 8.9$ ) и VSVG плазмидами, кодирующими поверхностные гликопротеины в пакующую клеточную линию HEK293T. После добавления раствора для трансфекции в среду чашки Петри с клетками инкубировали в термостате в течение 24 ч при температуре 37°C, а затем 72 ч при 32°C. За это время упакованные вирусы выделялись клетками в среду. По истечении срока инкубации среду с вирусами отфильтровывали ( $\varnothing$  0.45 мкм), немедленно замораживали в жидком азоте и хранили при –80°C.

Для определения титра вируса использовали метод иммуноокрашивания с антителами к HA-tag. Долю инфицированных клеток от числа всех клеток на стекле определяли визуально с помощью микроскопа Pascal. В результате проверки эффективности инфицирования по измерению доли светящихся клеток выбирали то соотношение среды с вирусом и среды культивирования, при котором минимальная эффективность составляла 90%.

Инфицирование клеток проводили на следующие сутки после посева на стекла. К клеткам добавляли культуральную среду с количеством лентивируса, обеспечивающим минимальную эффективность трансфекции 90%.

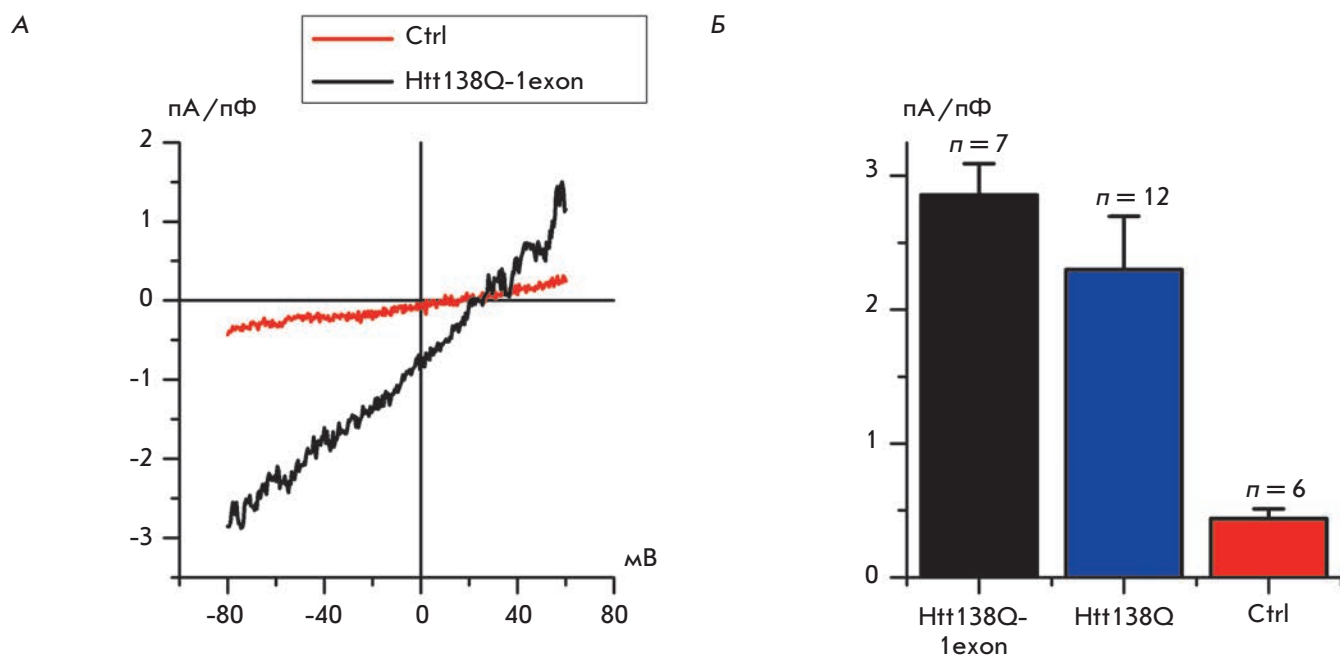
В контрольных экспериментах клетки инфицировали пустым экспрессионным вектором (контрольный вектор) (SIGMA, США).

В экспериментах с подавлением экспрессии STIM1 в дополнение к инфицированию клеток Lenti-Htt138Q-1exon использовали котрансфекцию плазмидой, кодирующей siРНК против STIM1 (SIGMA, США), и плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP), в соотношении 3 : 1.

В контрольных экспериментах использовали котрансфекцию плазмиды с siРНК, не имеющей специфической мишени (контрольная siРНК) (SIGMA, США), и плазмиды, кодирующей GFP, в соотношении 3 : 1.

### Электрофорез и иммуноблотинг

Клетки выращивали в чашках Петри диаметром 50 мм. После трансфекции клетки лизировали в буферном растворе следующего состава: 10 мМ Трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, 1% NP40



**Рис. 1.** Влияние лентивирусной экспрессии Htt138Q-1exon на уровень депо-управляемых токов в клетках SK-N-SH. А – средние ВАХ токов, индуцированных пассивным опустошением депо 1 мкМ тапсигаргина. Обсчет произведен на стационарном уровне развития исследуемых токов в клетках SK-N-SH с лентивирусной экспрессией Htt138Q-1exon (черная линия), в контрольных клетках SK-N-SH с лентивирусной экспрессией контрольного вектора (красная линия). Количество экспериментов указано на панели (Б). Б – стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале  $-80$  мВ в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в клетках SK-N-SH, трансфицированных полноразмерным Htt138Q (синяя заливка); с лентивирусной экспрессией Htt138Q-1exon (черная заливка), в контрольных клетках SK-N-SH (красная заливка). Уровень статистической значимости отличающихся результатов составляет  $p < 0.05$

(Nonidet P40, неионный детергент нонилфенилполиэтиленгликоль), 2 мМ EDTA, 0.2 мМ PMSF (ингибитор сериновых протеаз, фенилметансульфонил-фторид) с добавлением ингибиторов протеаз (PIC, Hoffmann-La Roche AG, Германия). Белки лизатов разделяли электрофоретически в 8% полиакриламидном геле в вертикальной камере и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Белки на иммуноблоте выявляли с использованием моноклональных антител против STIM1 (BD Bioscience, США) в разведении 1 : 250. В качестве вторых антител брали антитела козы против константной части иммуноглобулинов мыши (1 : 30000). Белки на иммуноблотах выявляли с помощью субстрата Super Signal Chemiluminescent Substrate (PIERCE, США). Опыты повторяли как минимум 3 раза, используя различные лизаты клеток. Для контроля равной загрузки дорожек использовали моноклональные антитела против  $\alpha$ -тубулина в разведении 1 : 1000 (SIGMA, США). Процентное содержание белка сравнивали с помощью стандартной программы сравнения интенсивности окрашивания сканированного иммуноблота.

### Электрофизиологические измерения

Для регистрации ионных токов использовали метод локальной фиксации потенциала (patch clamp) в условиях регистрации тока от целой клетки (whole cell) [17]. Все измерения выполняли с помощью усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Сопротивление микроэлектродов составляло 5–15 МОм. Последовательное сопротивление не компенсировали. Усиленный и предварительно отфильтрованный встроенным в усилитель двухполюсным фильтром Бесселя (частота среза 500 Гц) сигнал оцифровывали на частоте 5000 Гц с помощью платы АЦП L305 (L-Card, Россия). При записях интегральных токов клетки потенциал-мембраны поддерживали на уровне  $-40$  мВ. Периодически (каждые 5 с) потенциал на мембране изменяли до  $-100$  мВ (на 30 мс), а затем постепенно с постоянной скоростью 1 мВ/мс его величину изменяли до  $+100$  мВ. Шаг измерения составлял 0.5 мВ. Записанные токи нормировали относительно емкости клетки (10–30 пФ). Записи, полученные до активации исследуемых токов, использовали для вычитания тока утечки и тока через другие каналы.

### Растворы

В измерениях, выполненных в конфигурации whole cell, раствор регистрирующей пипетки содержал (в mM): 135 CsCl, 10 EGTA-Cs, 30 Hepes-Cs, 4.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.5 MgCl<sub>2</sub>, 4 Na-ATP, 0.4 Na<sub>2</sub>-GTP (pCa7), pH 7.3. Внеклеточный раствор содержал (в mM): 130 NMDG-Asp, 10 BaCl<sub>2</sub>, 20 Hepes-Cs, 0.01 нифедипина, pH 7.3.

Ионы бария были выбраны в качестве носителя тока для предотвращения кальций-зависимой инактивации. Нифедипин добавляли в раствор экспериментальной камеры для исключения возможного вклада во входящий интегральный ток потенциал-управляемых кальциевых каналов L-типа.

Для активации депо-управляемых токов во внеклеточный раствор добавляли 1 мкМ тапсигаргина, который подавали к объекту путем перфузии экспериментальной камеры. Время замены раствора в камере составляло менее 1 с.

### Обсчет

Обсчет электрофизиологических данных и линеаризация полученных вольт-амперных характеристик проводили с помощью программного пакета OriginPro 8.0.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы смоделировать БХ, клетки нейробластомы человека SK-N-SH инфицировали лентивирусом, несущим конструкцию, кодирующую продукт первого экзона гена белка хантингтина с полиглутаминовым трактом из 138 остатков глутамина (Htt138Q-lexon).

Для активации депо-управляемых кальциевых каналов в раствор добавляли 1 мкМ тапсигаргина – необратимого блокатора всех изоформ SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase), функционирующих в мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭР) в качестве кальциевых насосов и отвечающих за выкачивание ионов кальция из цитозоля в просвет ЭР. Поскольку считается, что аппликация тапсигаргина ведет к пассивному опустошению депо и не влияет на другие клеточные сигнальные пути, зарегистрированный ток можно приписать работе исключительно депо-управляемых каналов.

Анализ электрофизиологических экспериментов, в которых регистрировались интегральные кальциевые токи (patch clamp в конфигурации whole cell) в ответ на аппликацию 1 мкМ тапсигаргина, показал, что в клетках, экспрессирующих первый экзон мутантного хантингтина, депо-управляемый вход кальция был значительно выше, чем в контрольных клетках (ctrl), экспрессирующих пустой контрольный вектор (рис. 1А). Амплитуда тапсигаргин-индуцированных токов в клетках Htt138Q-lexon составила  $2.86 \pm 0.24$  пА/пФ, в то время как в контрольных

клетках амплитуда аналогичных токов была лишь  $0.44 \pm 0.07$  пА/пФ.

Проведя сравнение с данными, полученными нами ранее на клетках SK-N-SH, экспрессирующих полноразмерный мутантный хантингтин [13, 14], можно заключить, что экспрессия полноразмерного белка Htt138Q и продукта первого экзона Htt138Q-lexon практически одинаково влияет на уровень депо-управляемого входа кальция в клетки SK-N-SH (рис. 1Б). В клетках SK-N-SH, экспрессирующих N-концевой фрагмент патогенного хантингтина, амплитуда депо-управляемого входа кальция составляла  $2.86 \pm 0.24$  пА/пФ, в условиях же экспрессии полноразмерного патогенного хантингтина наблюдаемая амплитуда составляла  $2.30 \pm 0.40$  пА/пФ (рис. 1Б). Небольшое отличие в амплитудах депо-управляемого входа кальция в различных моделях БХ на клетках SK-N-SH статистически незначимо (для  $p < 0.05$ ).

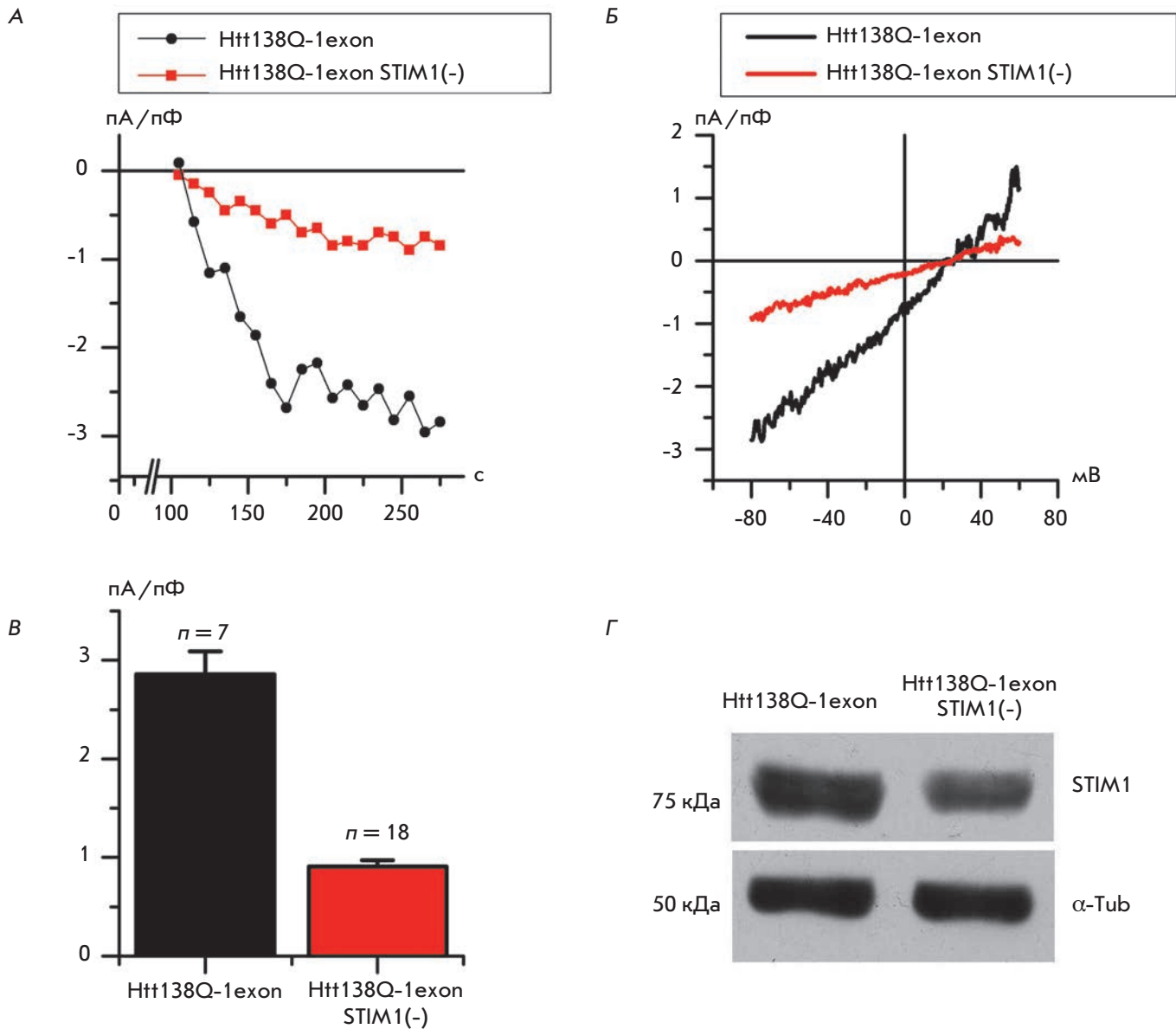
Таким образом, мы показали, что экспрессия N-концевого фрагмента мутантного хантингтина в клетках SK-N-SH представляет собой адекватную модель для исследования нарушений депо-управляемого входа кальция при БХ.

Следующей задачей данного исследования стало изучение роли белка STIM1 в активации депо-управляемых каналов в лентивирусной модели БХ.

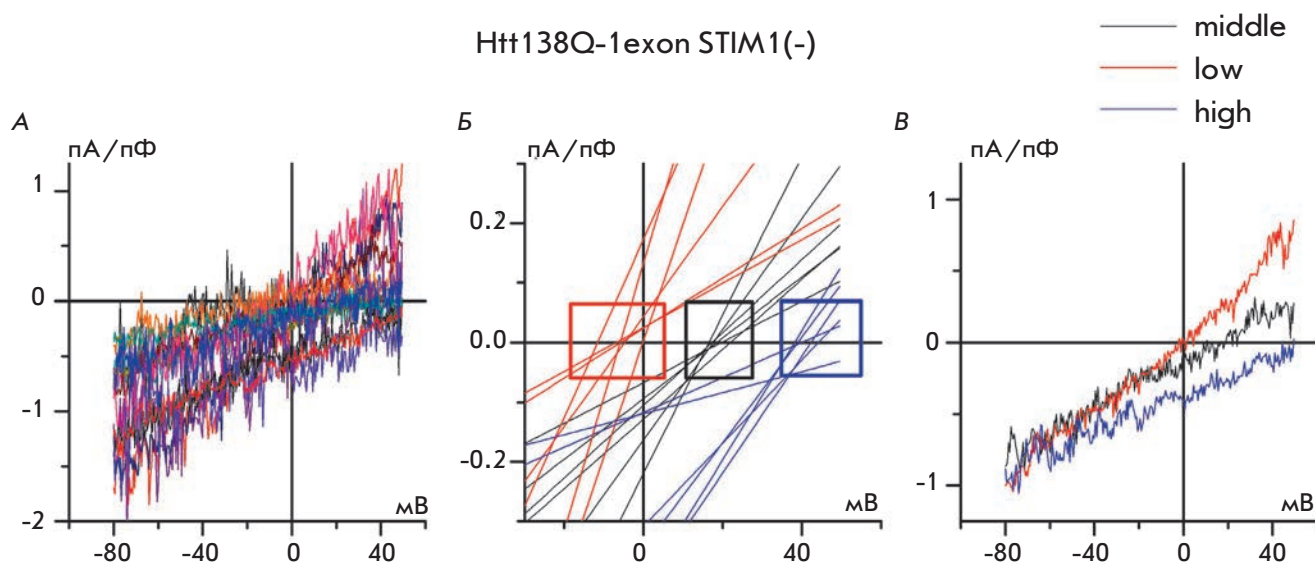
STIM1 – интегральный белок мембран ЭР и плазматической мембраны (ПМ) с единственным трансмембранным доменом. Считается, что в основном STIM1 локализован в мембранах ЭР, и только порядка 15–25% STIM1 локализовано на ПМ клеток [18].

В клетке STIM1 выступает в роли кальциевого сенсора в люменальном пространстве ЭР и активатора депо-управляемых каналов ПМ [18]. В норме, при заполненном состоянии клеточного депо, белок STIM1 в мембране ЭР находится в неолигомеризованном состоянии. Опустошение кальциевого депо вызывает ряд конформационных изменений, вследствие которых происходит кластеризация STIM1 и его транспорт в puncta-область, прилежащую к ПМ [18]. Наличие в C-концевой области белка STIM1 богатого пролином домена предполагает возможность белок-белкового взаимодействия между отдельными молекулами STIM1, а также взаимодействия с другими белками. Причем локализация STIM1 в мембранах ЭР, расположенных в непосредственной близости от ПМ, делает возможным прямое взаимодействие STIM1 в мембране ЭР с белками ПМ.

В качестве белков, взаимодействующих с эндоплазматическим STIM1, можно выделить различные белки-каналоформеры, а также плазматический пул белка STIM1. Показано, что STIM1 взаимодействует с белками, отвечающими за депо-управляемый каль-



**Рис. 2.** Влияние супрессии STIM1 на депо-управляемые токи кальция в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon. **А** – развитие тока (отнесенного к емкости клеток), вызванное приложением 1 мкМ тапсигаргина при потенциале  $-80$  мВ в клетках Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP (Htt138Q-1exon) (черные круги); трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP и siРНК, обеспечивающей супрессию STIM1 (Htt138Q-1exon STIM1(-)) (красные квадраты); представлены данные двух репрезентативных опытов. **Б** – средние ВАХ токов, индуцированных пассивным опустошением депо 1 мкМ тапсигаргина. Обсчет произведен на стационарном уровне развития исследуемых токов в клетках Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP (Htt138Q-1exon) (черная линия); трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP и siРНК, обеспечивающей супрессию STIM1 (Htt138Q-1exon STIM1(-)) (красная линия). Количество опытов указано на панели (В). **В** – стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале  $-80$  мВ в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в клетках Htt138Q-1exon, экспрессирующих GFP (Htt138Q-1exon) (черная заливка); экспрессирующих GFP и siРНК для супрессии STIM1 (Htt138Q-1exon STIM1(-)) (красная заливка). Уровень достоверности при статистически отличающихся результатах составляет  $p < 0.05$ . **Г** – иммуноблот, показывающий уровень экспрессии STIM1 в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP; и в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP и siРНК, обеспечивающей супрессию STIM1 (Htt138Q-1exon STIM1(-))



**Рис. 3.** Депо-управляемые токи в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon с подавленной экспрессией белка STIM1. А — неусредненные ВАХ токов, индуцированных пассивным опустошением депо 1 мкМ тапсигаргина. Обсчет произведен на стационарном уровне развития исследуемых токов в клетках Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP и siРНК, обеспечивающей супрессию STIM1 (каждая цветная линия представляет собой отдельный эксперимент). Б — фрагменты линейаризаций ВАХ неусредненных токов, представленных на панели (А) с низкими (красные линии), средними (черные линии) и высокими (синие линии) потенциалами реверсии. В — средние ВАХ токов, индуцированных пассивным опустошением депо 1 мкМ тапсигаргина. Обсчет произведен на стационарном уровне развития исследуемых токов в клетках Htt138Q-1exon, трансфицированных плазмидой для экспрессии контрольного белка GFP и siРНК, обеспечивающей супрессию STIM1: для токов с низким потенциалом реверсии (low) (красная линия); для токов со средним потенциалом реверсии (middle) (черная линия); для токов с высоким потенциалом реверсии (high) (синяя линия)

циевый вход в различных типах клеток: белками семейства TRPC [19] и с белком Orail [20].

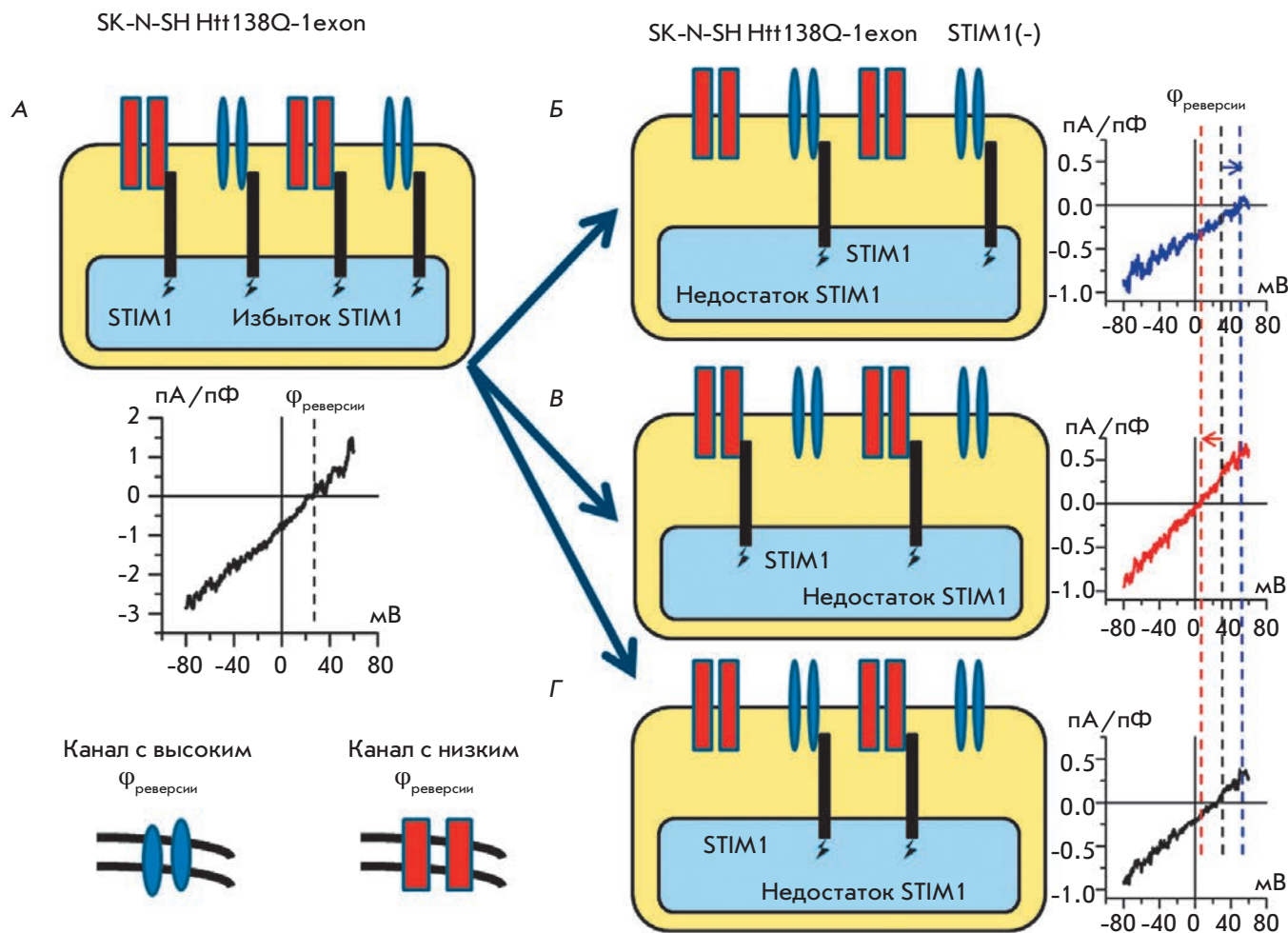
Экспрессия STIM1 в клетках Htt138Q-1exon была подавлена с помощью малых интерферирующих РНК. Эффективность супрессии была подтверждена с помощью иммуноблота (рис. 2Г).

Результаты электрофизиологических экспериментов показали, что супрессия STIM1 приводит к выраженному уменьшению амплитуды тапсигаргин-индуцированных токов с  $2.86 \pm 0.24$  пА/пФ в клетках Htt138Q-1exon до  $0.91 \pm 0.07$  пА/пФ в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-) (рис. 2А,Б,В). Таким образом, можно сделать вывод, что белок STIM1 является важным звеном в активации депо-управляемого ответа в клетках Htt138Q-1exon.

Потенциал реверсии усредненного тока через депо-управляемые каналы в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-) не отличался от потенциала реверсии усредненного тока в клетках Htt138Q-1exon (рис. 2Б). Однако при одновременном построении на одном графике вольт-амперных характеристик (ВАХ) отдельных экспериментов оказалось, что депо-управляемые токи в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-) об-

ладают широким спектром различных потенциалов реверсии, что говорит о разной селективности каналов, опосредующих депо-управляемый ток (рис. 3А). Детальный анализ отдельных ВАХ зарегистрированных депо-управляемых токов в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-), а также их линейаризации показал, что потенциалы реверсии этих токов распадаются на три различные группы (рис. 3Б,В). Часть ВАХ обладали низкими потенциалами реверсии – не более 5 мВ, вторая группа обладала средними потенциалами реверсии около 20 мВ и, наконец, третья группа имела высокие потенциалы реверсии – более 35 мВ. Таким образом, становится понятно, что в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-) за депо-управляемый вход кальция отвечает более одного типа депо-управляемых каналов с различной селективностью для  $Ca^{2+}$ . При этом амплитуды токов с высокими, средними и низкими потенциалами реверсии практически не отличались друг от друга при потенциале  $-80$  мВ (рис. 3Б) и составляли  $0.88 \pm 0.20$ ,  $0.87 \pm 0.17$  и  $1.00 \pm 0.28$  пА/пФ соответственно.

Одной из гипотез, объясняющих подобные наблюдения, может стать предположение о том, что в клет-



**Рис. 4.** Схема возможного пути активации депо-управляемых каналов с различными потенциалами реверсии в клетках SK-N-SH Htt138Q-1exon STIM1(-). А – в условиях не лимитированного количества белка STIM1 может происходить активация всех типов каналов, что дает среднюю ВАХ токов со средним значением потенциала реверсии. При недостатке белка STIM1 может происходить преимущественная активация одного из типов депо-управляемых каналов: с высоким потенциалом реверсии (Б) или с низким потенциалом реверсии (В). Также может происходить эквивалентная активация обоих типов каналов (Г). Каналы с высоким потенциалом реверсии представлены синими овалами и синей линией на графике ВАХ. Каналы с низким потенциалом реверсии представлены красными прямоугольниками и красной линией на графике ВАХ. Активация обоих типов каналов показана черной линией на графиках ВАХ. Потенциалы реверсии отмечены пунктирами соответствующего цвета

ках Htt138Q-1exon существуют два различных типа каналов, управляемых по депо-зависимому механизму, со сходными амплитудами при потенциале  $-80$  мВ, но различающиеся по селективности. В таком случае, когда в клетках Htt138Q-1exon активируются тапсигаргин-индуцированные токи, ВАХ интегральных токов представляет собой суперпозицию двух типов активированных депо-управляемых каналов (рис. 2Б). Пока в клетках Htt138Q-1exon достаточно белка STIM1, отвечающего за активацию депо-управляемого входа, различные по селективности каналы активи-

руются приблизительно в одинаковой мере, что дает нам усредненную ВАХ с потенциалом реверсии, лежащим примерно посередине между потенциалами реверсии каждого из каналов (рис. 2Б, 4А). Когда же мы имеем дело с супрессией белка STIM1 в клетках Htt138Q-1exon STIM1(-), то из-за недостатка STIM1 равновесие может смещаться в сторону преимущественной активации депо-управляемых каналов с высоким (рис. 4Б) или низким (рис. 4В) потенциалом реверсии. Также возможен вариант, при котором даже в условиях недостатка STIM1 будут активированы

каналы с различными потенциалами реверсии в приблизительно одинаковом количестве (рис. 4Г), что объясняют эксперименты на клетках Htt138Q-lexon STIM1(-), в которых наблюдались средние значения потенциала реверсии.

Разумеется, это лишь одно из возможных объяснений, и картина происходящего может быть значительно сложнее описанной. Так депо-управляемые токи в клетках Htt138Q-lexon могут представлять собой суперпозицию не двух, а трех или более каналов. В частности, в ранее опубликованных работах в клетках эмбрионального почечного эпителия человека (клеточная линия НЕК293) нами показано наличие четырех типов каналов с абсолютно различными биофизическими свойствами, способных активироваться по депо-зависимому механизму [21]. Аналогичные данные получены нами на клетках эпидермоидной карциномы человека А431 [22–24].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в представленной работе мы показали, что экспрессия N-концевого фрагмента мутантного белка хантингтина позволяет эффективно смоделировать ранее описанные изменения депо-управляемого кальциевого входа в клетках нейроblastомы человека. Также мы установили, что активация депо-управляемых кальциевых каналов в клетках SK-N-SH требует присутствия кальциевого сенсора, белка STIM1. Кроме того, можно говорить о том, что в клетках SK-N-SH, моделирующих БХ, за депо-управляемый вход кальция отвечают, по меньшей мере, два различных типа каналов. ●

*Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-14-00720 (ВВ, ЮК, МР, ЕК)), грантами РФФИ, программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», грантом Era.NetRUS, стипендией Президента РФ.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Graham S., Yuan J.P., Ma R. // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2012. V. 237. № 2. P. 111–118.
- Pieri M., Caioli S., Canu N., Mercuri N.B., Guatteo E., Zona C. // Exp. Neurol. 2012. V. 247. P. 349–358.
- Wojda U., Salinska E., Kuznicki J. // IUBMB Life. 2008. V. 60. № 9. P. 575–590.
- Bezprozvanny I. // Trends Mol. Med. 2009. V. 15. № 3. P. 89–100.
- Vonsattel J.P., Myers R.H., Stevens T.J., Ferrante R.J., Bird E.D., Richardson E.P. Jr. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1985. V. 44. № 6. P. 559–577.
- Harjes P., Wanker E.E. // Trends Biochem. Sci. 2003. V. 28. № 8. P. 425–433.
- 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.
- Zeron M.M., Hansson O., Chen N., Wellington C.L., Leavitt B.R., Brundin P., Hayden M.R., Raymond L.A. // Neuron. 2002. V. 33. № 6. P. 849–860.
- 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.
- Bossy-Wetzel E., Petrilli A., Knott A.B. // Trends Neurosci. 2008. V. 31. № 12. P. 609–616.
- 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.
- Vosler P.S., Brennan C.S., Chen J. // Mol. Neurobiol. 2008. V. 38. № 1. P. 78–100.
- Глушанкова Л.Н., Зими́на О.А., Вигонт В.А., Можаяева Г.Н., Безпрозванный И.Б., Казначеева Е.В. // ДАН. 2010. Т. 433. № 6. С. 842–845.
- Wu J., Shih H.-P., 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.
- 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.
- 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.
- Hamill O.P., Sakmann B. // Nature. 1981. V. 294. № 5840. P. 462–464.
- Dziadek M.A., Johnstone L.S. // Cell Calcium. 2007. V. 42. № 2. P. 123–132.
- Yuan J.P., Zeng W., Huang G.N., Worley P.F., Muallem S. // Nat. Cell. Biol. 2007. V. 9. № 6. P. 636–645.
- Peinelt C., Vig M., Koomoa D.L., Beck A., Nadler M.J., Koblan-Huberson M., Lis A., Fleig A., Penner R., Kinet J.P. // Nat. Cell. Biol. 2006. V. 8. № 7. P. 771–773.
- Bugaj V., Alexeenko V., Zubov A., Glushankova L., Nikolaev A., Wang Z., Kaznacheeva E., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 17. P. 16790–16797.
- Kaznacheeva E., Glushankova L., Bugaj V., Zimina O., Skopin A., Alexeenko V., Tsiokas L., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. № 32. P. 23655–23662.
- Gusev K., Glouchankova L., Zubov A., Kaznacheeva E., Wang Z., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // J. Gen. Physiol. 2003. V. 122. № 1. P. 81–94.
- Kaznacheeva E., Zubov A., Gusev K., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 1. P. 148–153.