

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи



МИХАЙЛОВА

Елена Радиславовна

РОЛЬ ФЕРМЕНТА ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-
ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МЕЖКЛЕТОЧНОМ ПЕРЕНОСЕ
ПАТОГЕННЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ
БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Научный руководитель

доктор биологических наук

Ирина Владимировна Гужова

Санкт-Петербург

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
2.	ВВЕДЕНИЕ.....	5
3.1.	Актуальность проблемы.....	5
3.2.	Цели и задачи исследования	6
3.3.	Основные положения, выносимые на защиту	7
3.4.	Научная новизна полученных результатов	7
3.5.	Теоретическое и практическое значение работы	7
3.6.	Личный вклад автора	8
3.7.	Апробация работы	8
3.8.	Финансовая поддержка работы.....	8
3.9.	Публикации	8
3.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
3.1.	Общая характеристика нейродегенеративных заболеваний	11
3.2.	Полиглутаминовые заболевания.....	15
3.2.1.	Общие сведения.....	15
3.2.2.	Модели полиглутаминовых заболеваний.....	19
3.2.3.	Агрегация полиглутаминовых белков.....	21
3.3.	МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ПЕРЕНОС БЕЛКОВ	22
3.3.1.	Прионные белки.....	22
3.3.2.	Неприонные белки.....	24
3.4.	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.....	36
4.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	42
4.1.	Белки и пептиды.....	42
4.2.	Клеточные культуры и условия культивирования.....	42
4.3.	Ультрафильтрация: метод ловушки на фильтре	44
4.4.	ГАФД иммуноферментный анализ	45
4.5.	Проточная цитометрия	46
4.6.	Клеточный иммуноферментный анализ	46
4.7.	Определение активности дегидрогеназ по Мосману	47
4.8.	Определение активности лактатдегидрогеназы	47
4.9.	ПААГ-ДСН электрофорез и иммуноблоттинг	48
4.10.	Статистическая обработка результатов	48

5. РЕЗУЛЬТАТЫ	49
5.1. ГАФД и polyQ высвобождаются из клеток, индуцированных к экспрессии НТТQ103	49
5.2. ГАФД способствует прион-подобному поведению Q58 в нормальных клетках	57
5.3. ГАФД транспортирует polyQ внутрь живых клеток с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза	62
5.4. В клеточной модели БХ внеклеточные агрегаты polyQ-ГАФД обладают большей цитотоксичностью, чем внутриклеточные агрегаты. ...	65
6. ОБСУЖДЕНИЕ	69
7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	77
8. ВЫВОДЫ	79
9. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	80
10. ПРИЛОЖЕНИЕ	99
БЛАГОДАРНОСТИ	104

1. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТФ — аденозинтрифосфат

БА — болезнь Альцгеймера

БАС — боковой амиотрофический склероз

БП — болезнь Паркинсона

БТШ70 — белок теплового шока 70 кДа

БХ — болезнь Хантингтона

ГАФД — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

ДСН — додецилсульфат натрия

ИФА — иммуноферментный анализ

ЛДГ — лактатдегидрогеназа

НАД — никотинамидадениндинуклеотид

ПААГ — полиакриламид-гель

ПонаА — Понастерон А

СОД1 — супероксиддисмутаза-1

тТГ — тканевая транскламиназа

ФСБ — фосфатно-солевой буфер

ФСБТ — фосфатно-солевой буфер с добавлением 0,05% Тритон X-100

ЦНС — центральная нервная система

A β — амилоидный бета-пептид

APP — (англ. amyloid precursor protein) белок предшественник бета-амилоида

НТТ — хантингтин

EGFP — (англ. enhanced green green fluorescent protein) зеленый флуоресцентный белок

mНТТ — мутантный хантингтин

polyQ — полиглутаминовый тракт

2. ВВЕДЕНИЕ

2.1. Актуальность проблемы

Нейродегенеративные заболевания, как правило, связаны с накоплением внеклеточных (болезнь Альцгеймера, болезнь, БА) или внутриклеточных (болезнь Хантингтона, БХ, Боковой амиотрофический склероз, БАС, болезнь Паркинсона, БП и др.) агрегатов мутантных белков (Brundin et al, 2010). При БА гибнут нейроны гиппокампа и пирамидальные нейроны лобной доли, при БП — дофаминергические нейроны черной субстанции, при БХ — шипиковые нейроны стриатума (Mattson, Magnus, 2006). По мере развития заболевания, агрегаты патогенных белков появляются в других регионах мозга, зона поражения расширяется, и гибнут новые нейроны в соседних структурах мозга. В последние годы обнаружено явление горизонтального переноса, в ходе которого белковые агрегаты проникают в здоровые клетки через плазматические мембраны и изменяют конформацию нормальных клеточных белков, способствуя, таким образом, распространению заболевания подобно прионным белкам (Brundin et al, 2010; Ren et al, 2009).

Болезнь Хантингтона — наследственная неврологическая патология — обусловлена наличием мутации в гене белка хантингтина, находящемся в коротком плече 4-й хромосомы. Данная мутация приводит к увеличению количества триплетов CAG и, как следствие, к появлению аномально длинной полиглутаминовой последовательности (polyQ) в N-терминальном домене молекулы. При наличии полиглутаминовой последовательности длиной свыше 35 остатков образуются цитотоксические олигомеры и агрегаты, что приводит к многочисленным нарушениям нейрональной физиологии и, в конечном счете, к массовой гибели клеток. Растущие агрегаты вовлекают в своё образование разнообразные нормальные клеточные белки; присутствие агрегатов в клетке инициирует

дальнейшее нарушение механизмов фолдинга белков и приводит к дальнейшей агрегации (Sugars, Rubinshtein, 2003).

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) является ферментом, который катализирует шестой этап гликолиза. Помимо традиционных функций аэробного метаболизма глюкозы, последние исследования выявили дополнительные функции ГАФД в неметаболических процессах: регуляция экспрессии генов и регуляция окислительно-восстановительных посттрансляционных модификаций (Kadmiri et al, 2014). Было также показано, что ГАФД содержится в патологических агрегатах tau-белка (Minjarez et al, 2013; Naletova et al, 2008; Wang et al, 2005) и может физически связываться с A β (Schulze et al, 1993). Более того, комплекс ГАФД с polyQ был воспроизведён в клеточных моделях БХ и других polyQ заболеваний (Wu et al, 2007; Koshy et al, 1996). В наших предыдущих работах было показано, что ГАФД значительно увеличивает агрегацию mHTT (Guzhova et al, 2011; Lazarev et al, 2015) и мутантной супероксиддисмутазы (mSOD1), ответственной за возбуждение БАС (Гаврилова, 2002; Лазарев и др., 2013). Агрегация происходила особенно активно в присутствии фермента тканевой трансклутаминазы, которая катализирует образование связей между глутаминовыми и лизиновыми остатками.

Мы предположили, что ГАФД также может принимать участие в межклеточной миграции полиглутаминовых олигомеров и агрегатов; таким образом, главной задачей нашего исследования было выявить роль ГАФД в развитии патологии при БХ.

2.2. Цели и задачи исследования

Целью данной работы было установить роль глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в межклеточном переносе мутантного хантингтина. Исходя из этого, были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать процесс выхода и белковый состав патогенных агрегатов мутантного хантингтина из клеток-моделей болезни Хантингтона.

2. Определить влияние вышедших комплексов ГАФД и polyQ на жизнеспособность клеток.
3. Исследовать механизмы внутриклеточного транспорта ГАФД — индивидуально и в комплексе с polyQ.
4. Определить вклад ГАФД в прион-подобную активность мутантного хантингтина.
5. Сравнить токсичность внеклеточных и внутриклеточных агрегатов комплексов polyQ-ГАФД.

2.3. Основные положения, выносимые на защиту

1. ГАФД высвобождается из мёртвых и повреждённых клеток в комплексе с polyQ, и эти комплексы токсичны для клеток.
2. ГАФД в комплексе с polyQ способна проникать внутрь живых клеток и усиливать агрегацию нативных белков.
3. Внеклеточные агрегаты комплексов polyQ-ГАФД более токсичны, чем их внутриклеточные аналоги.

2.4. Научная новизна полученных результатов

В настоящей работе впервые показано, что ГАФД в комплексе с polyQ способна высвобождаться из мёртвых или повреждённых клеток в клеточной модели БХ, и эти комплексы обладают цитотоксическим эффектом. Показано, что ГАФД усиливает способность polyQ проникать внутрь живых клеток и агрегацию нативных белков с полиглутаминовым трактом нормальной длины. Доказано, что экстраклеточные комплексы polyQ-ГАФД более токсичны, чем внутриклеточные агрегаты.

2.5. Теоретическое и практическое значение работы

Полученные результаты свидетельствуют о значительной роли ГАФД в развитии нейродегенеративных патологий, таких, как болезнь Хантингтона. Доказана ведущая роль ГАФД в межклеточном переносе

polyQ, а также показана её способность усиливать прион-подобные свойства polyQ.

2.6. Личный вклад автора

Все экспериментальные процедуры, описанные в работе, были проведены автором лично. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

2.7. Апробация работы

Основные положения работы были представлены на восемнадцатой Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье. Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Санкт-Петербург, 2015), на девятнадцатой Международной Пущинской школе-конференции молодых учёных «Биология — наука XXI века» (Москва, Пущино, 2015), на VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды». (Новосибирск, 2015) и на V съезде биохимиков России (Сочи, Дагомыс, 2016).

2.8. Финансовая поддержка работы.

Работа проходила при поддержке Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (грант № 14-50-00068) и гранта президента в рамках научного проекта № МК-8274.2016.4.

2.9. Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus.

1. Lazarev VF, Benken KA, Semenyuk PI, Sarantseva SV, Bolshakova OI, **Mikhaylova ER**, Muronetz VI, Guzhova IV, Margulis BA. GAPDH binders as potential drugs for the therapy of polyglutamine diseases: design of a new screening assay. FEBS Lett. 2015, 589:581-7.

2. Lazarev VF, Nikotina AD, Semenyuk PI, Evstafyeva DB, **Mikhaylova ER**, Muronetz VI, Shevtsov MA, Tolkacheva AV, Dobrodumov AV, Shavarda AL, Guzhova IV, Margulis BA. Properties of substances inhibiting aggregation of oxidized GAPDH: Data on the interaction with the enzyme and the impact on its intracellular content. Data Brief. 2016, 7:524-528.
3. Lazarev VF, Nikotina AD, Semenyuk PI, Evstafyeva DB, **Mikhaylova ER**, Muronetz VI, Shevtsov MA, Tolkacheva AV, Dobrodumov AV, Shavarda AL, Guzhova IV, Margulis BA. Small molecules preventing GAPDH aggregation are therapeutically applicable in cell and rat models of oxidative stress. Free Radic Biol Med. 2016, 92:29-38.
4. Lazarev VF, Nikotina AD, **Mikhaylova ER**, Nudler E, Polonik SG, Guzhova IV, Margulis BA. Hsp70 chaperone rescues C6 rat glioblastoma cells from oxidative stress by sequestration of aggregating GAPDH. Biochem Biophys Res Commun. 2016, 470(3):766-771.
5. **Mikhaylova ER**, Lazarev VF, Nikotina AD, Margulis BA, Guzhova IV. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase augments the intercellular transmission and toxicity of polyglutamine aggregates in a cell model of Huntington disease. J Neurochem. 2016, 136:1052-1063.

Список тезисов:

1. **Михайлова Е.Р.**, Лазарев В.Ф., Никотина А.Д. Роль гликолитического фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в межклеточном переносе мутантного хантингтина. Восемнадцатая Всероссийская медико-биологическая конференция молодых исследователей «Человек и его здоровье. Фундаментальная наука и клиническая медицина». Санкт-Петербург, 18 апреля 2015. С. 344-345.
2. **Михайлова Е.Р.**, Лазарев В.Ф., Никотина А.Д., Маргулис Б.А., Гужова И.В. Роль клеточного фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в переносе полиглутаминовых патологий. Девятнадцатая Международная Пущинская школа-конференция

молодых учёных «Биология — наука 21 века». Москва, Пущино, 20-24 апреля 2015. С. 252-253.

3. **Михайлова Е.Р.**, Лазарев В.Ф., Маргулис Б.А., Гужова И.В. Межклеточный перенос мутантного хантингтина и роль фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в этом процессе. Седьмой Российский симпозиум «Белки и пептиды». Новосибирск, 12–17 июля 2015. С. 345.
4. **Михайлова Е.Р.**, Лазарев В.Ф., Никотина А.Д., Маргулис Б.А., Гужова И.В. Горизонтальный перенос полиглутаминовых патологий и роль гликолитического фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в этом процессе. V съезд биохимиков России. Сочи, Дагомыс, 4-8 октября 2016. Acta Naturae, спецвыпуск, том 2, 2016. С. 64

3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

3.1. Общая характеристика нейродегенеративных заболеваний

Нейродегенеративные заболевания — большая группа заболеваний преимущественно позднего возраста, для которых характерна медленно прогрессирующая гибель определенных групп нервных клеток и одновременно нарастающая атрофия соответствующих отделов головного и/или спинного мозга, непосредственно не связанная с известными внешними или внутренними факторами (интоксикация, сосудистая недостаточность, инфекции или метаболические расстройства) (рис. 1) (Дамулин, 2004; Иллариошкин и др., 2006).

В настоящее время становится ясно, что такие болезни, как болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), болезнь Хантингтона (БХ), полиглутаминовые (polyQ) заболевания, боковой амиотрофический склероз (БАС) и прионные патологии развиваются по одному и тому же механизму. Патологоанатомические и биохимические исследования выявили различные белковые включения, скапливающиеся внутри и снаружи от нейронов больного мозга, такие как синильные бляшки при БА, состоящие из β -амилоида и нейрофибриллярные узелки, содержащие τ -белок, или тельца Леви при БП, состоящие из α -синуклеина. Хотя роль этих белковых включений в патогенезе долгое время оставалась дискуссионной, последние молекулярно-генетические исследования доказали, что именно мутации ответственны за наследственные формы этих болезней, так как мутантные белки утрачивают природную конформацию, что ведет к формированию белковых агрегатов и к их перепродукции (Popiel et al., 2011).

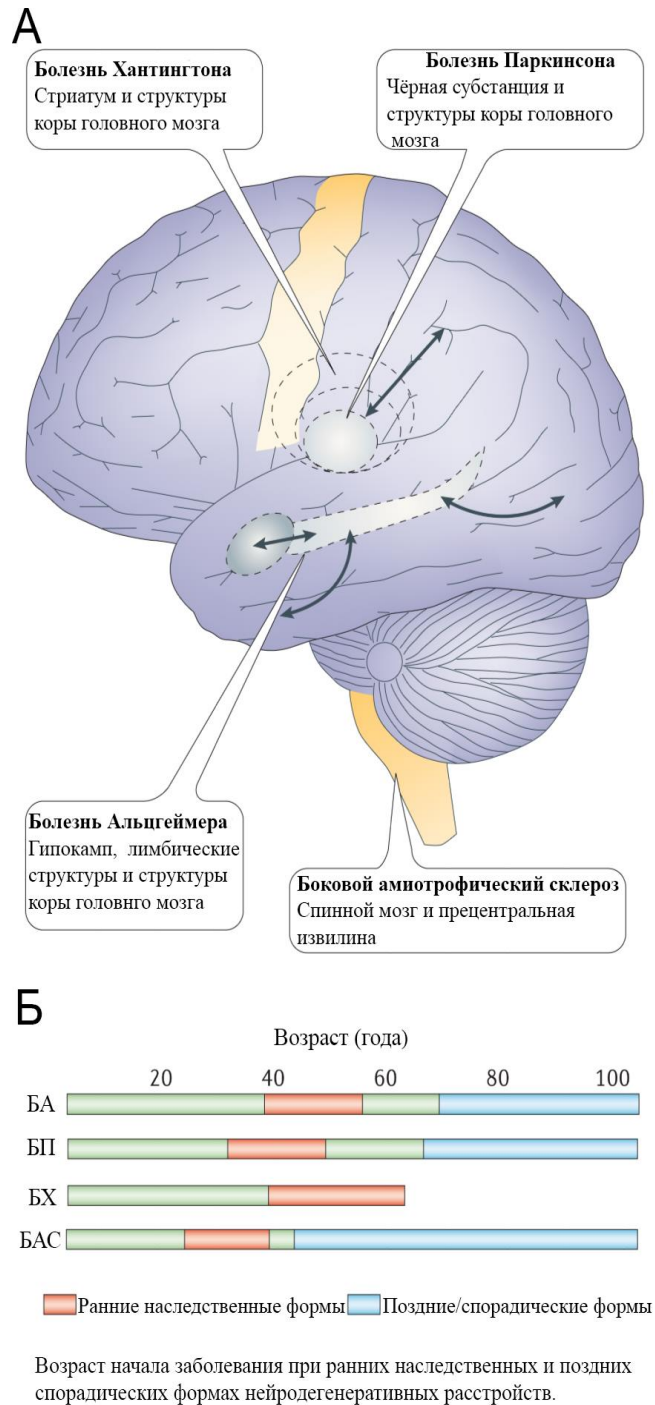


Рис. 1. Поражение нейронов и распространение патологии при различных нейродегенеративных расстройствах (по Mattson and Magnus, 2006)

- А. Различные нейродегенеративные заболевания (БАС, БП, БХ и БА) поражают различные области головного мозга взрослого человека и со временем распространяются на соседние регионы.
- Б. Возраст начала заболевания при ранних наследственных и поздних спорадических формах нейродегенеративных расстройств.

Нейродегенеративные заболевания могут быть наследственными или приобретёнными, спорадическими. Факторы внешней среды могут стать триггером нарушения конформации нормальных клеточных белков, которые приводят к формированию внутри- и внеклеточных агрегатов. Избыточное фосфорилирование, гликозилирование, активизация перекисного окисления липидов могут быть связаны с каскадом патологических клеточных биохимических процессов (Иллариошкин и др., 2006). Образ жизни, воздействие токсинов (металлы, пестициды, органические фосфаты), инфекции и лихорадки увеличивают вероятность внутриклеточной агрегации белков (Дамулин, 2004; Quinn et al, 1996). При спорадических случаях заболевания наблюдают возникновение белковых включений в мозге подобно таковым, которые возникают при наследственных формах (Popiel et al., 2011).

Важно заметить, что агрегаты, составленные разными клеточными белками, аккумулярованными в нейронах разных областей мозга, при разных нейродегенеративных патологиях, имеют очень похожую структуру (Taylor et al., 2002). Все эти данные, взятые вместе, убеждают нас в том, что нарушения конформации клеточных белков, ведущие к последующей их агрегации, чрезвычайно важны в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, которые впоследствии выделили в класс конформационных заболеваний (Soto, 2003; Ross and Poirier, 2005) (рис. 2).

Агрегационные способности белков зависят в значительной степени от физико-химических свойств первичной структуры белка. В основе абберрантного сворачивания различных внутриклеточных белков лежат общие клеточные и молекулярные механизмы. Нарушение конформации приводит к агрегации белков и к их скоплению в виде внеклеточных бляшек или внутриклеточных включений и, как следствие, к дегенерации в определённых областях мозга или других отделах ЦНС (Пономарёв, 2007) (см. Приложение, табл. 1, Kokalj et al., 2005).

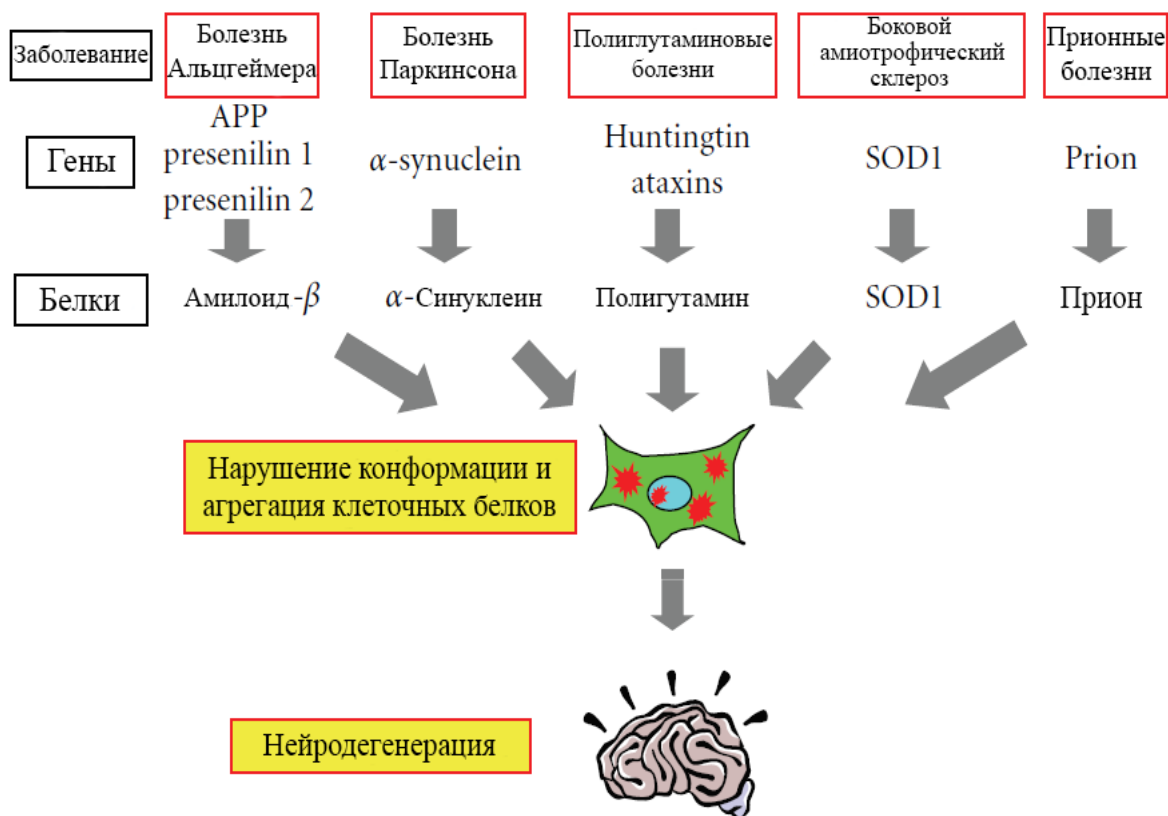


Рис. 2. Белки с нарушенной конформацией и агрегированные белки как молекулярная основа патогенеза нейродегенеративных заболеваний (по Popiel et al., 2011).

Генетические мутации, ответственные за наследственные формы различных нейродегенеративных заболеваний, приводят к возникновению неправильной конформации и агрегации белков, которые накапливаются в виде включений внутри и снаружи нейронов и, как следствие, к нейродегенерации.

Существующие системы защиты клетки предотвращают и сдерживают повышение уровня белковых агрегатов, но только до определенной степени. К таким системам относятся, в основном, белки теплового шока (шапероны и клеточные антиоксиданты) и убиквитин-протеасомальный аппарат клетки. При обширной агрегации белков, обе системы перегружаются, и запускается токсичный каскад (Дамулин, 2004; Иллариошкин и др., 2006; Kokaļj et al, 2005).

Процесс нейродегенерации сопровождается окислительным стрессом, понижением уровня клеточных антиоксидантов, аберрантной сигнализацией, дисфункцией мембранной проницаемости и проницаемости митохондрий, что в итоге приводит к запрограммированной гибели клеток. Порядок этих событий до сих пор неясен (Дамулин, 2004; Иллариошкин и др., 2006; Kokaļj

et al,2005). Вполне возможно, что при окислительном стрессе белки изменяются таким образом, что становятся более амилоидогенными, в то время как белки, участвующие в образовании амилоидных фибрилл, могут сами провоцировать окислительный стресс (Quinn et al, 1996; Яхно, Преображенская, 2003). Активация окислительного стресса в нейронах влияет на глиальные клетки (воспалительная реакция), что приводит к митохондриальной дисфункции и к апоптозу (Иллариошкини др., 2006).

В развитии каждого конкретного нейродегенеративного заболевания играют роль определенные триггеры, к числу которых относятся недостаточность убиквитин-протеасомной системы клетки, дефекты шаперонной защиты, окислительный стресс, апоптоз и др. (Иллариошкин, 2006). При нейродегенеративных заболеваниях страдают преимущественно нейроны и глиальные клетки базальных ганглиев и стволовых структур, вырабатывающие ацетилхолин, дофамин, серотонин. Недостаточность отдельных нейромедиаторов также определяет клиническую картину нейродегенеративного заболевания (Иллариошкин и др., 2006).

В настоящее время используют клиническую классификацию нейродегенеративных заболеваний (Пономарёв, 2007) (см. Приложение, Табл. 2.). Общая характеристика белков, связанных с нейродегенеративными заболеваниями, приведена в Приложение в сводной таблице 3 (см. Приложение, Табл. 3.).

3.2. Полиглутаминовые заболевания.

3.2.1. Общие сведения

Полиглутаминовые (polyQ) заболевания представляют собой группу патологий, приводящих к дисфункции и в конечном итоге гибели нейронов в определенных областях головного мозга. К этой группе относят девять заболеваний: болезнь Хантингтона (БХ); спиноцеребеллярная атаксия (SCA) тип 1, тип 2, тип 6, тип 7 и тип 17; болезнь Мачадо-Джозефа (MJD /SCA3),

спино-бульбарная мышечная атрофия, тип 1, сцепленная с X-хромосомой (SMA1/SBMA) и дентаторубропаллидолюисова атрофия (DRPLA).

Все эти заболевания обусловлены наличием мутации в причинном гене, приводящей к увеличению количества триплетов CAG и, как следствие, к появлению аномально длинной полиглутаминовой последовательности в молекуле белка. Для каждого заболевания характерно своё пороговое число повторов, которое приводит к патологии (таблица 1). Частота полиглутаминовых заболеваний в среднем составляет 1–10 случаев на 100000 человек, но может быть выше в некоторых регионах. Все эти заболевания наследуются по аутосомно-доминантному принципу, за исключением SMA1/SBMA, которое связано с мутацией в гене рецептора андрогена, находящегося в X-хромосоме (Figiel et al, 2012).

Белки, ответственные за заболевания этого семейства, не связаны друг с другом, различаются по функциям и внутриклеточной локализации (Таблица 1). Тем не менее, полиглутаминовые заболевания имеют много общих патологических особенностей: (1) увеличение числа CAG триплетов в причинных генах; (2) симптомы этих заболеваний, как правило, появляются в среднем возрасте и прогрессируют вплоть до смерти, в течение примерно 15-20 лет. Чем длиннее полиглутаминовые последовательности на концах белков, тем в более раннем возрасте начинается заболевание (Persichetti et al, 1994). (3) Патологическим признаком всех полиглутаминовых заболеваний является наличие внутриклеточных агрегатов (телец включений), образованных мутантными белками в головном мозге.

Табл. 1. Полиглутаминовые заболевания и причинные гены/белки

Полиглутаминовое заболевание	Причинный белок	Ген и его локализация	Функция белка в норме	pCAG	Поражаемый участок ЦНС
Болезнь Хантингтона	Хантингтин	IT15, htt, 4p16.3	Клеточный транспорт, каркасный белок	н: 7–35 п: 36–170	Стриатум
SCA1	Атаксин-1	ATXN1, 6p23	Фактор связывания хроматина, ко-рецептор транскрипции,	н: 27–36 п: 39–82	Мозжечок
SCA2	Атаксин-2	ATNX2, 12q24.1	Компонент стресс-гранул, репрессор трансляции	н: 27–36 п: 39–82	Мозжечок
SCA3 болезнь Мацудо-Джозефа	Атаксин-3	ATNX3, 14q24.3–32.2	Процессинг протеолитических и других белков	н: 12–43 п: 52–86	Спинной мозг
SCA6	Кальциевый канал, α -1A субъединица	CACNA1, 19p13	α 1A субъединица и другие P/Q-типы Са-канала	н: 8–14 п: 20–33	Мозжечок
SCA7	Атаксин-7	ATXN7, 3p14.1	Возможно роль в регуляции транскрипции	н: 7–35 п: 38–200	Сетчатка глаза
SCA17	TATA-связывающий белок	TBP, 6q27	Главный фактор инициации транскрипции	н: 24–44 п: 45–63	Мозжечок
SBMA спино-бульбарная мышечная атрофия	Андрогеновый рецептор	AR, Xq11-12	рецептор	н: 11–35 п: 38–62	Спинной мозг и ствол мозга
DRPLA Дентаторubro-паллидолюсcова атрофия	DRPLA белок или атрофин-1	ATN1; DRPLA, 12p13.31	Ко-регулятор транскрипции	н: 7–34 п: 48–93	Мозжечок и ствол мозга

Мутантные белки экспрессируются во всех клетках организма, но избирательная дистрофия наблюдается в конкретных регионах мозга (Bradford et al, 2010). Кроме того, CAG повторы имеют тенденцию увеличиваться из поколения в поколение, что может привести к риску появления бессимптомных пациентов, способных передавать более раннюю и более тяжелую форму заболевания следующему поколению (Li and Conforti, 2010).

Болезнь Хантингтона наиболее изучена и связана, как правило, с гибелью нейронов в полосатом теле и в III и V слоях коры. Потеря функциональности нейронов приводит к нарушениям мышечной координации, к когнитивным нарушениям и психиатрическим проблемам. Ген *IT15*, кодирующий белок хантингтина (НТТ), расположен в 4-й хромосоме. Этот белок экспрессируется в нейрональных и других тканях, но его уровень в стриатуме выше, чем в других органах (Harjes, Wanker, 2003). Функции нормального Нтт полностью в настоящее время не выявлены. Это высококонсервативный крупный белок, содержащий пролин/глутамин богатый домен и три HEAT региона на N-концевой части молекулы (DiFiglia et al, 1997). Нтт присутствует в ядре, теле клетки, дендритах и нервных окончаниях (Wanker et al, 1997). Предполагается, что немутантный Нтт участвует в клеточном транспорте и может функционировать как каркасный белок (Brusse et al, 2007).

Спиноцеребеллярные атаксии типов 1–3, 6 и 7 являются наиболее часто встречаемыми среди аутосомно-доминантных наследуемых мозжечковых атаксий (ADCA) и составляют примерно 50–60% от всех семейных форм ADCA во всем мире (Klockgether 2003; Paulson, Ammache, 2001; Rub et al, 2013). Массовая гибель клеток Пуркинье приводит к нарушению функционирования мозжечка и таким симптомам, как дисбаланс и нарушение координации. Атаксии часто сопровождаются дизартрией, дистонией и глазодвигательными расстройствами (Naito, Oyanagi, 1982).

Дентаторубропаллидолюисова атрофия обусловлена мутацией в гене *SCA1* (*атрофин-1*), что приводит к наличию аномально длинного polyQ тракта этого белка. У пациентов с данным заболеванием наблюдаются атаксия, миоклонус, эпилепсии и деменции (Suzuki et al, 2012; Tanaka et al, 2012).

Спино-бульбарная мышечная атрофия, или болезнь Кеннеди, характеризуется медленно прогрессирующей мышечной слабостью и атрофией бульбарных мышц, мышц лица и конечностей. Патологически, болезнь Кеннеди связана с потерей двигательных нейронов в спинном мозге и стволе головного мозга (Cowin et al, 2012) и вызвана аномальным увеличением количества триплетов CAG в первом экзоне гена рецептора андрогена (AR) в хромосоме Xq11–12 (Simanainen et al, 2011; Lin et al, 2000).

3.2.2. Модели полиглутаминовых заболеваний.

В настоящее время одним из основных экспериментальных подходов в изучении нейродегенеративных заболеваний является моделирование патогенеза заболеваний на трансгенных животных.

Существует около 100 генетических мышинных моделей полиглутаминовых заболеваний. Большинство из них относятся к БХ. Существующие модели в различной степени схожи с человеческими полиглутаминовыми заболеваниями. Особый интерес представляют мышинные трансгенные модели, экспрессирующие полноразмерные причинные гены. Например, модель YAC трансгенных мышей с дрожжевой искусственной хромосомой несёт ген HTT с 18, 46, 72, или 128 CAG-повторами и почти полностью воспроизводит особенности человеческой БХ (Figiel et al, 2012). Другим примером является модель мышей B05, в которой ген *SCA1* находится под контролем проксимального промотора клеточного специфического гена Пуркинье (PCP2/L7), и продукт гена (*SCA1* с 82 CAG), экспрессируется только в клетках Пуркинье (Lin et al, 2000). Биохимические изменения, наблюдаемые у мышей B05 подобны тем, которые происходят у

пациентов SCA1 (Oz et al, 2000). В таких мышинных моделях, как R6/1, R6/2 и R6/5 экспрессируется только первый экзон гена мутантного HTT с увеличенными повторами CAG (Figiel et al, 2012). В других моделях причинный ген является химерным, т.е. состоит из гибридной последовательности мышинной/человеческой ДНК с удлиненными CAG повторами. Например, у мышей HdhQ92 и HdhQ111 первый экзон гена HTT функционально заменён на гибридные последовательности мышинной/человеческой ДНК с 50, 92, или 111 CAG повторами (White et al, 1997; Wheeler et al, 1999).

В течение последних 5 лет разрабатываются новые модели полиглутаминовых заболеваний на основе использования индуцированных плюрипотентных клеток (IPC). Фибробласты, полученные от пациентов, перепрограммируют *in vitro* с использованием ленти- или ретровирусных векторов, несущих гены Oct4, Klf4, Sox2 и c-Мус, характерные для природных плюрипотентных клеток (в том числе для эмбриональных стволовых клеток). После этого в культуральную среду добавляют нейрональные факторы дифференцировки (например, BDNF), чтобы вызвать превращение перепрограммированных клеток в функциональные нейроны. В результате получают клеточную культуру, наиболее близко напоминающую нейроны, пострадавшие от полиглутаминовых патологий.

Первая культура клеток, полученная от неврологического больного, была описана Парком и др. (Park et al, 2008). На сегодняшний день получено и охарактеризовано несколько нейронных клеточных линий от пациентов SCA2 и БХ. Камнасио с коллегами получили нейрональные клеточные культуры от двух гомозиготных пациентов БХ с 42/44 и 39/42 CAG повторностями; от гетерозиготной больной с 17/45 CAG повторностями и от здорового взрослого человека с 15/17 CAG повторностями. Они обнаружили, что длина патологического CAG тракта не увеличивалась во время перепрограммирования клеток и долгосрочного культивирования и дифференцировки клеток в нейроны *in vitro* (Camnasio et al, 2012).

В другом исследовании IPC клетки были получены из фибробластов R6/2 мышей (с НТТ 1 экзоном, содержащим 144 CAG повторностей) и перепрограммированы в нейроны. Фенотип БХ клетки начинали приобретать во время дифференцировки (Castiglioni et al, 2012).

3.2.3. Агрегация полиглутаминовых белков.

Наиболее важным свойством полиглутаминовых белков является их склонность к образованию цитотоксичных олигомеров и агрегатов. Накопление белковых мономеров polyQ приводит к следующей стадии патогенного процесса, которая начинается с обработки вышеуказанных полипептидов специфичными протеазами, кальпаином и каспазами, которые отрезают polyQ последовательности от содержащих их белков (Wellington et al, 2002).

Олигомеризация polyQ трактов, вырезанных из мутантных белков, по-видимому, является необходимым условием для их накопления в крупных агрегатах. Олигомерные polyQ субъединицы могут быть нескольких типов. Более короткие субъединицы, состоящие из чистых фрагментов НТТ, образуют β -структуры (β -нити или β -слои), в то время как более крупные polyQ цепи преобразуются в шаровидные структуры, которые производятся из фибрилл (Poirier et al, 2002).

Олигомеры polyQ могут образовывать агрегаты, различные по форме и размеру. Процесс агрегации предполагает стадию зарождения в одном или нескольких участках цитоплазмы (Ossato et al, 2010). В соответствии с моделью «полярной застежки-молнии», polyQ полипептиды могут образовывать структуры β -слоев, в которых каждые 20 аминокислот антипараллельно сгибаются и образуют антипараллельные тракты, соединённые водородными связями между амидами. Такие структуры могут служить в качестве «семян» для образования агрегатов (Perutz et al 1994; 2002).

Согласно другой модели агрегации, глутамины причинного белка (например, НТТ) ковалентно связываются с лизинами других белков с помощью процессов, катализируемых тканевой трансглютаминазой (tTG) (Gentile et al, 1998; Violante et al, 2001). Белок tTG принадлежит к группе близкородственных ферментов, катализирующих сшивание остатка глутаминила одного белка/пептида с остатком лизина другого белка/пептида (Karpuij et al, 2002). Участие tTG в патогенезе БХ подтверждается тем фактом, что цистамин, ингибитор tTG, заметно улучшает функции опорно-двигательного аппарата и выживаемость в животных мышинных моделях БХ (Amantea et al, 2006). Также было показано, что каспазо-опосредованное отрезание polyQ тракта от патогенного белка является необходимым условием для tTG реакции (Tarlac and Storey, 2003). Последующее сшивание глутаминов с лизинами при помощи tTG приводит к образованию агрегатов. Эти агрегаты нерастворимы в растворах сильных денатурирующих агентах, таких как ДСН или гуанидин гидрохлорид (Violante et al, 2001).

Растущие агрегаты, состоящие из полиглутаминовых белков, можно наблюдать в виде включений в различных местах цитоплазмы, но их значительная часть находится в ядрах клеток. Скорее всего, эти включения возникают из polyQ моно- или олигомеров, которые обрабатываются калпаинами, каспазами или металлопротеазами и транспортируются в ядро, где они и агрегируют (Johri, Beal, 2010; Cisbani, Cicchetti, 2012).

3.3. МЕЖКЛЕТОЧНЫЙ ПЕРЕНОС БЕЛКОВ

3.3.1. Прионные белки

Исследования межклеточного переноса белков начались в 1980-е годы, после открытия инфекционной природы прионного белка. У млекопитающих прионы вызывают заболевания – трансмиссивные губчатые энцефалопатии (ТГЭ). Как и большинство нейродегенеративных заболеваний, расстройства, обусловленные прионами, в основном носят спорадический характер, но в редких случаях наследуются. В отличие от

других нейродегенеративных расстройств, прионные болезни могут передаваться между представителями одного вида или даже между представителями разных видов. К таким заболеваниям относят различные варианты болезни Крейтцфельдта-Якоба, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, фатальную семейную бессонницу и болезнь Куру у человека; губчатую энцефалопатию у крупного рогатого скота («коровье бешенство»). Прионные заболевания могут рассматриваться как уникальные из-за возможности распространения инфекционных белков не только от клетки к клетке, но и от организма к организму (Aguzzi, 2008).

Все известные прионные заболевания млекопитающих вызываются прионным белком в изоформе PrP^{Sc}. Прионные заболевания поражают головной мозг и другие нервные ткани, на данный момент они неизлечимы и смертельны (Liao et al, 1986).

У дрожжей прионы могут функционировать как наследственные эпигенетические факторы, и передаются в цитозоле от материнской клетки к дочерней во время клеточного деления. При этом клеточный шаперон Hsp104 обеспечивает дезагрегацию белковых молекул.

На данный момент описано три возможных механизма, с помощью которых прионы могут передаваться от клетки к клетке: благодаря прямому клеточному контакту, через туннельные нанотрубки и в составе экзосом (рис. 3).

Туннельные нанотрубки представляют собой мембраносвязанные трубчатые каналы, образующиеся между соседними клетками. Трубчатые каналы имеют диаметр 50–200 нм и длину 10–80 мкм, содержат актиновые нити, используемые для транспорта мембраносвязанных везикул и органелл. Gouset с соавторами обнаружили, что прионные белки могут транспортироваться между клетками через туннельные нанотрубки внутри мембраносвязанных везикул (Gousset et al, 2009).

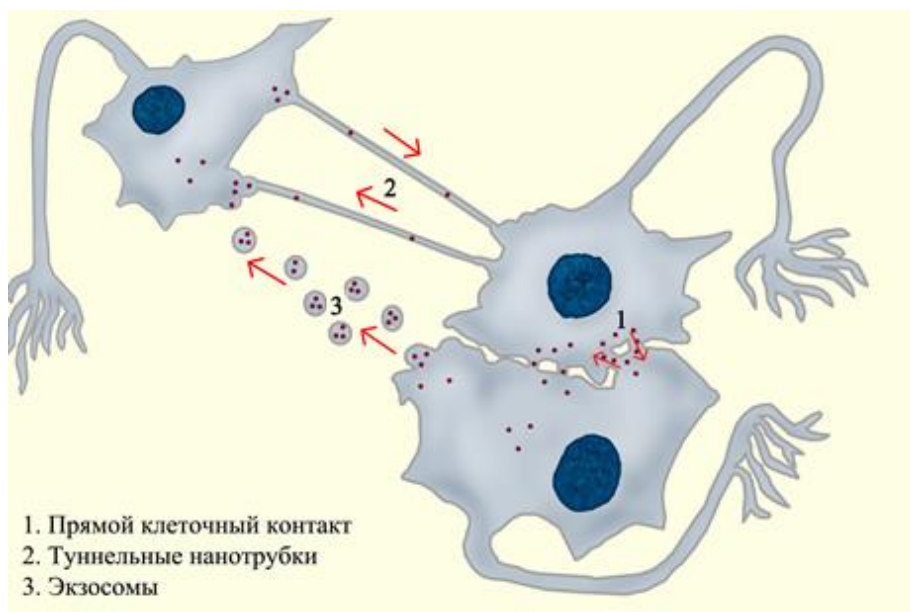


Рис. 3. Механизмы передачи прионных белков от клетки к клетке

Экзосомы представляют собой мелкие мембранные везикулы диаметром около 100 нм, содержащие белки и РНК, и участвующие в экзоцитозе. Fevrier с соавторами показали, что клетки активно выделяют экзосомы, содержащие прионные белки, а другие клетки способны поглощать эти экзосомы (Fevrier et al, 2004).

При прямом клеточном контакте прионные белки способны передаваться между соседними клетками (Kanu et al, 2002). Более того, прионы способны передаваться от мёртвых клеток живым (Paquet et al, 2007). Агрегированные белки также могут выходить в синаптическую щель и поглощаться клетками-акцепторами, откуда они могут проникать в цитозоль этих клеток и инициировать новые акты агрегации (Hofmann et al, 2013).

3.3.2. Неприонные белки

Конформационные нейродегенеративные заболевания (протеинопатии), такие как Болезнь Альцгеймера, Болезнь Хантингтона, амиотрофический боковой склероз, болезнь Паркинсона и др., все чаще ассоциируют с прионными заболеваниями в связи с токсичностью неправильно упакованных белков.

Общей чертой многих нейродегенеративных заболеваний является отложение амилоидных агрегатов, богатых β -складчатыми структурами, образованными белками, специфичными для этих заболеваний. Эти белковые агрегаты непосредственно или косвенно вызывают дисфункции нейронов в определённых отделах головного мозга или ЦНС. С течением времени агрегаты появляются в других регионах, зона поражения расширяется, и гибнут новые нейроны в соседних структурах мозга или ЦНС.

В течение последних нескольких лет исследования конформационных нейродегенеративных заболеваний продемонстрировали возможность горизонтального переноса белковых агрегатов от клетки к клетке для некоторых протеинопатий (Guo and Lee, 2014).

Последние исследования показывают, что внутриклеточные или внеклеточные белковые агрегаты способны проходить сквозь клеточные мембраны и проникать в другие клетки, где они инициируют новые акты агрегации нативных белковых молекул. Данный процесс непосредственно способствует распространению патогенеза нейродегенеративных заболеваний, и прогрессирование заболевания связано с межклеточным переносом патогенных белков. Такое «поведение» патогенных белков напоминает распространение прионных белков (Guo and Lee, 2014).

Таким образом, между прионными заболеваниями и другими наиболее распространёнными нейродегенеративными заболеваниями можно выделить сходные черты, а именно:

1. Штамповка и агрегация неправильно фолдированных белков.
2. Фибриллярные агрегаты входят в клетки, избегая механизмы везикулярного транспорта, и напрямую контактируют со своей целью.
3. Внутриклеточные агрегаты могут свободно высвобождаться во внеклеточное пространство.

Эти положения могут объяснить локальное распространение нейродегенеративных заболеваний.

Таупатии

Белок tau (tau-белок, τ -белок), в норме контролирующей стабильность микротрубочек, в патогенном состоянии полимеризуется в филаменты, которые формируют нейрофибриллярные клубочки (Goedert et al, 2006).

Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показали, что клетки способны секретировать tau и поглощать его посредством эндоцитоза. Белок tau может мигрировать от клетки к клетке, подобно прионным белкам (Saman et al, 2012; Simon et al, 2012). В патологических условиях tau белок подвергается гиперфосфорилированию, что приводит к снижению его связывания с тубулином и, как следствие, к агрегации. В результате этого процесса образуются нерастворимые парные спиральные фибриллы и фибриллярные сплетения (Spires et al, 2006).

Как было показано в экспериментах с применением мышинных моделей, наиболее токсичными, по сравнению с фибриллами и фибриллярными сплетениями, являются олигомеры tau белка, они способны мигрировать между соседними нейронами (Berger, 2007; Lasagna-Reeves et al, 2012). Наличие внутри- и внеклеточных агрегатов способствует развитию таупатий и нейродегенерации (Lasagna-Reeves et al, 2012). В более ранних исследованиях на культурах тканей было показано, что экзогенный tau-белок, добавленный в питательную среду, может действовать в качестве агониста мускариновых M1 и M3 рецепторов, вызывая быстрое и устойчивое увеличение внутриклеточного кальция, что также приводит к клеточной гибели (Diaz-Hernandez et al, 2010).

Установлено, что эндогенный tau-белок может секретироваться как в свободной форме, так и в составе экзосом или микровезикул. Это зависит от изоформ tau-белка и от типа клеток (Mohamed et al, 2013). Секреция tau-белка повышается при увеличении активности каспазы-3 (DeCalignon et al, 2012).

Видимо, секреция tau-белка происходит с помощью нетрадиционного пути, так как он не имеет сигнального мотива для сортировки и транспорта в эндоплазматическом ретикулуме (Smalheiser, 2007; Lakkaraju and Rodriguez-Boulan, 2008). Мембранные и цитозольные формы tau-белков секретируются внутри экзосом и таким образом могут попадать в межклеточное пространство (Mohamed et al, 2013).

Ряд других исследований доказал, что tau-белок может высвобождаться в межклеточное пространство в свободной форме, не окружённый мембранными структурами. Также tau-белки могут быть захвачены и высвобождены в межклеточное пространство с помощью секреторных лизосом и секреторных гранул (Andreï et al, 1999). Наконец, пузырьки, образующиеся в аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме, также могут быть вовлечены в секрецию tau. Белок tau, как цитозольный белок, находится на поверхности этих пузырьков, и когда пузырьки сливаются с мембраной, tau-белок оказывается в межклеточном пространстве (Ponnambalam and Baldwin, 2003).

Поглощённый tau-белок способен инициировать агрегацию нативных белков внутри клетки. В экспериментах *in vivo* экзогенный мутантный человеческий tau-белок инициирует образование филаментов tau-белка дикого типа у трансгенных мышей. Так, при инъекции экстракта мозга трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный человеческий tau P301S, в мозг трансгенным мышам, экспрессирующим человеческий tau-белок дикого типа, белок дикого типа начинал собираться в филаменты и агрегаты. С течением времени нейрофибриллярные клубочки tau росли и распространялись из энторинального кортекса в анатомически связанные соседние регионы мозга (Clavaguera et al, 2009).

Другие два независимых исследования показали, что агрегаты tau-белка могут инициировать формирование нейрофибриллярных клубочков *in vivo*. Обе исследовательские группы использовали би-трансгенных мышей, несущих активатор трансгена и трансгенный мутантный белок tau P301L.

Мыши в обоих исследованиях демонстрировали прогрессирующие изменения tau-белка, такие как неправильное сворачивание белка, гиперфосфорилирование и появление фибрилл и агрегатов. Обе исследовательские группы показали, что со временем tau-патология распространяется за пределы энторинального кортекса, региона, где активен трансгенный белок и где первоначально начинаются патогенные изменения (Clavaguera et al, 2013; DeCalignon et al, 2012).

В экспериментах *in vitro* на нейронных клеточных культурах также было подтверждено, что экзогенные агрегаты tau-белка индуцируют полимеризацию внутриклеточного tau-белка (DeCalignon et al, 2012; Liu et al, 2012; Frost et al, 2009).

Патологии, обусловленные амилоидом β

Амилоид β (A β), пептид, состоящий из 42 аминокислотных остатков (A β 42), образует внеклеточные токсичные для нейронов амилоидные бляшки в ходе протеолиза из нерастворимого протеолитического фрагмента нормального белка-предшественника (APP).

Как показывают эксперименты *in vitro*, внутриклеточный и внеклеточный A β способны быстро распространяться от клетки к клетке между астроцитами и первичными нейронами крысы в условиях совместного культивирования (Wang et al, 2011). Это подтверждает способность A β передаваться между различными типами клеток центральной нервной системы в виде «семян» подобно инфекционным прионным белкам. В экспериментах *in vivo* на трансгенных мышах, экспрессирующих человеческий APP, было доказано, что агрегация A β ускоряется при введении экстрактов мозга пациентов с болезнью Альцгеймера (Kane et al, 2000) или экстрактов мозга старых трансгенных мышей (Meyer-Luehmann et al, 2006). В обоих случаях экстракты содержали агрегаты A β . Схожий эффект наблюдался и при введении заранее сформированных агрегатов чистых белков A β (Meyer-Luehmann et al, 2006). В других исследованиях было показано, что

внутрибрюшинное введение экстрактов мозга, обогащенных А β , индуцировало церебральный амилоидоз. Для развития болезни требовался длительный инкубационный период и большее количество вводимого А β по сравнению с прямой интрацеребральной инъекцией (Eisele et al, 2010). Данные эксперименты подтверждают способность А β к межклеточному переносу.

Nath с соавторами с помощью донорно-акцепторной модели культуры клеток SH-SY5Y *in vitro* показали, что передача А β зависит от прямых клеточных контактов (Nath et al, 2012). В результате различных процессов во внеклеточном пространстве образуются олигомеры А β , которые посредством эндоцитоза или других механизмов, таких как, например, прямые клеточные контакты, проникают внутрь клетки. В цитозоле олигомеры ингибируют функцию протеосом и вызывают тем самым гибель клетки. Кроме того, экзогенные олигомеры индуцируют агрегацию внутриклеточного А β , который содержится в аппарате Гольджи, эндоплазматическом ретикулуме и в мембранах эндосом, лизосом и митохондрий. Подавление агрегации белков внутриклеточными шаперонами может вызвать образование фибрилл А β , что в дальнейшем приводит к образованию внутриклеточных амилоидных бляшек и к клеточной гибели (Sakono and Zako, 2010).

Синуклеинопатии

Белок α -синуклеин представляет собой основной компонент телец Леви. Впервые распространение агрегатов белка α -синуклеин *in vivo* показали Kordower с соавторами (2008). Пациенту с болезнью Паркинсона трансплантировали эмбриональные нейроны, в которых *postmortal* были обнаружены агрегаты α -синуклеина. Таким образом, тельца Леви, имеющиеся в мозге больного БП, индуцировали агрегацию белков в здоровых пересаженных нейрональных клетках. Впоследствии это явление наблюдалось и в экспериментах с мышами. При введении мышиных стволовых клеток, несущих EGFP (enhanced green fluorescent protein, зелёный

флуоресцентный белок), трансгенным мышам, у которых избыточно экспрессировался человеческий α -синуклеин, через неделю в EGFP-меченых клетках обнаруживали внутриклеточный человеческий α -синуклеин и, в некоторых случаях, тельца включений (Desplats et al, 2009).

Дальнейшие эксперименты показали, что экзогенные агрегаты α -синуклеина индуцируют агрегацию эндогенного аналога и тем самым ускоряют развитие патологии. Luk с соавторами (2009) использовали трансгенных мышей (A53T), экспрессирующих мутантный человеческий α -синуклеин. При введении лизатов мозга старых A53T мышей, содержащих агрегаты α -синуклеина, в мозг молодых мышей, наблюдали ускорение развития болезни и сокращение периода жизни, в то время как при введении лизатов мозга молодых A53T мышей, лишенных агрегатов, развитие патологии не наблюдали. Более того, рекомбинантный α -синуклеин может образовывать фибриллы и агрегировать *in vitro* (Luk et al, 2009).

Транспорт фибриллярного α -синуклеина может происходить посредством аксонального транспорта (Freundt et al, 2012). Мономерные и агрегированные формы α -синуклеина могут выходить из клеток в качестве содержимого цитозольных пузырьков при помощи механизма экзоцитоза. В свою очередь, агрегированные формы α -синуклеина (фибриллы и олигомеры) проникают в клетки с помощью обычного эндоцитоза (Lee et al, 2005).

Другие эксперименты показали, что трансдукция α -синуклеина, предварительно сформировавшего фибриллярные структуры, в клетки с гиперэкспрессией α -синуклеина приводит к образованию нерастворимых внутриклеточных включений, богатых β -складчатой структурой. Кроме того, с помощью с-Мус меченных α -синуклеиновых фибрилл, Luk с соавторами (2009) доказали, что растворимый эндогенный α -синуклеин преобразуется в нерастворимую форму под действием фибрилл (Luk et al, 2009).

При совместном культивировании различных клеточных линий экзогенные α -синуклеины (мономерные, олигомерные или фибриллярные

формы) способны проникать внутрь соседних клеток и вызывать агрегирование внутриклеточных белковых аналогов (Desplats et al, 2009; Hansen et al, 2011).

На данный момент известно, что α -синуклеин может высвобождаться в межклеточное пространство несколькими способами: (1) синуклеины могут выходить из поврежденных клеток с нарушенной целостностью мембраны, непосредственно перемещаться через клеточную мембрану и проникать в соседние клетки. (2) Синуклеины также могут передаваться от клетки к клетке с помощью обычного экзоцитоза и эндоцитоза (3). Более того, туннельные нанотрубки, образующие прямое соединение между двумя клетками, потенциально позволяют синуклеинам свободно переходить из одной клетки в другую (4). Наконец, синуклеины могут передаваться путем непосредственного синаптического контакта (5) (Visanji et al, 2013).

Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутаза (СОД) относится к группе антиоксидантных ферментов. У человека присутствует три изоформы супероксиддисмутазы. Мутации изоформы СОД1 могут привести к латеральному амиотрофическому склерозу (ЛАС).

Недавние эксперименты показали, что и мутантная СОД1, и СОД1 дикого типа, имеющая неверную конформацию, могут передаваться от клетки к клетке подобно прионным белкам. При некоторых видах мутаций, СОД1 формирует агрегаты, способные инициировать агрегацию внутриклеточного белка. При изучении ЛАС в моделях *in vitro*, лизаты спинного мозга с мутантной СОД1 приводили к образованию фибрил СОД1 дикого типа.

Агрегаты СОД1 проникают в клетку с помощью везикулярных структур и быстро покидают их, получая возможность реагировать со своими внутриклеточными аналогами. По некоторым данным фибриллы СОД1 также

входят в соседние нейроны с помощью механизма макропиноцитоза (Witan et al, 2009).

Другие авторы показали, что патогенные формы СОД1 выходят из мёртвых клеток в виде агрегатов и фибрилл или попадают во внеклеточную среду на поверхности экзосом, секретируемых живыми клетками, и входят в соседние клетки посредством макропиноцитоза или рецептор-опосредованного эндоцитоза. Патогенные формы СОД1 вызывают агрегацию внутриклеточных нативных форм СОД1, что приводит к распространению патологии (Grad et al, 2014).

Полиглутаминовые патологии

Мутантный белок хантиггин (НТТ), содержащий полиглутаминовый тракт из более чем 35–40 повторов, склонен образовывать агрегаты в цитоплазме и/или в ядре (DiFiglia et al, 1997).

В пионерской работе Ren с соавторами было показано, что добавление в культуральную среду НТТ агрегатов или рекомбинатных фрагментов мутантного НТТ приводило к формированию ядерных телец включений в культуре клеток НЕК-293 (Ren et al, 2009). Более того, авторы показали, что полиглутаминовые агрегаты подобно прионным белкам могут реплицироваться и распространяться в дочерние клетки во время клеточного деления (Ren et al, 2009). В экспериментах *in vitro* было показано, что синтетические пептиды polyQ или рекомбинантные фрагменты мутантного НТТ легко принимаются культуральными клетками (Ren et al, 2009) и могут способствовать полимеризации растворимого внутриклеточного НТТ.

Такие агрегаты сохраняются на протяжении более 80 поколений в длительной культуре клеток, что предполагает самоподдерживающийся процесс самоагрегации подобно репликации прионов (Ren et al, 2009). Однако, естественная передача агрегированного НТТ от клетки к клетке при совместном культивировании с НЕК-293 была малоэффективна и заметно возрастала при лизисе донорных клеток, содержащих агрегаты НТТ. Эти

данные дают основание полагать, что механизм передачи связан со смертью клеток (Ren et al, 2009).

Общие черты механизма процесса межклеточного переноса при нейродегенерации

Для того чтобы мутантный белок распространялся подобно прионам, должны быть выполнены четыре основных условия. Во-первых, белковый агрегат должен быть способен удлинять растворимые полипептидные цепи и фрагменты для создания дополнительных сайтов удлинения и усиления агрегации. Во-вторых, «заражённые» агрегатами клетки должны постоянно синтезировать неагрегированные формы белка. В-третьих, передающиеся агрегаты должны высвобождаться из клеток-доноров. В-четвертых, агрегаты должны быть способны связываться и входить в клетки-реципиенты.

Неправильно фолдированные белки (олигомеры и протофибриллы), находящиеся в цитоплазме нейрона-донора, могут выступать в качестве «затравки», инициирующей агрегацию нативных растворимых белков, что может привести к образованию нерастворимых белковых форм (агрегаты и фибриллы). Эти формы могут быть подвергнуты частичной фрагментации, что приведёт к образованию «семян», инициирующих следующие акты агрегации (рис. 4).

Небольшое количество белковых агрегатов может высвобождаться во внеклеточное пространство в свободной форме (не окружённой мембранными структурами) через повреждённые мембраны или внутри мембраносвязанных везикул, таких как экзосомы. Также агрегаты и белки выходят из поврежденных клеток. Свободные формы агрегированного белка могут проникать внутрь соседней клетки непосредственно через плазматическую мембрану или в местах повреждения целостности мембраны нейрона-реципиента. Также имеет место жидкостный или рецептор-опосредованный эндоцитоз. В этом случае экзосомы, содержащие патогенные белки, сливаются с мембраной нейрона-реципиента.

Межклеточный перенос белков может происходить сквозь туннельные нанотрубки, которые непосредственно соединяют цитоплазму двух клеток, или посредством транс-синаптических контактов (Wang et al, 2011) (рис. 4).

Одновременно в клетках могут работать несколько механизмов межклеточного переноса белков или один механизм, предпочтительный для данного белка. Механизмы могут действовать между клеточными телами или быть транс-синаптическими (Hofmann et al, 2013).

Интернализированные агрегаты в дальнейшем могут вызвать агрегацию нативных белков нейрона-реципиента. В итоге могут образоваться токсичные формы белков, которые приводят к образованию патологических телец включения (Hofmann et al, 2013).

Несмотря на то, что фибриллярные структуры и крупные белковые агрегаты являются наиболее заметными признаками различных нейродегенеративных заболеваний, они не обязательно являются токсичными формами, которые непосредственно вызывают нейродегенерацию (Cohen et al, 2013).

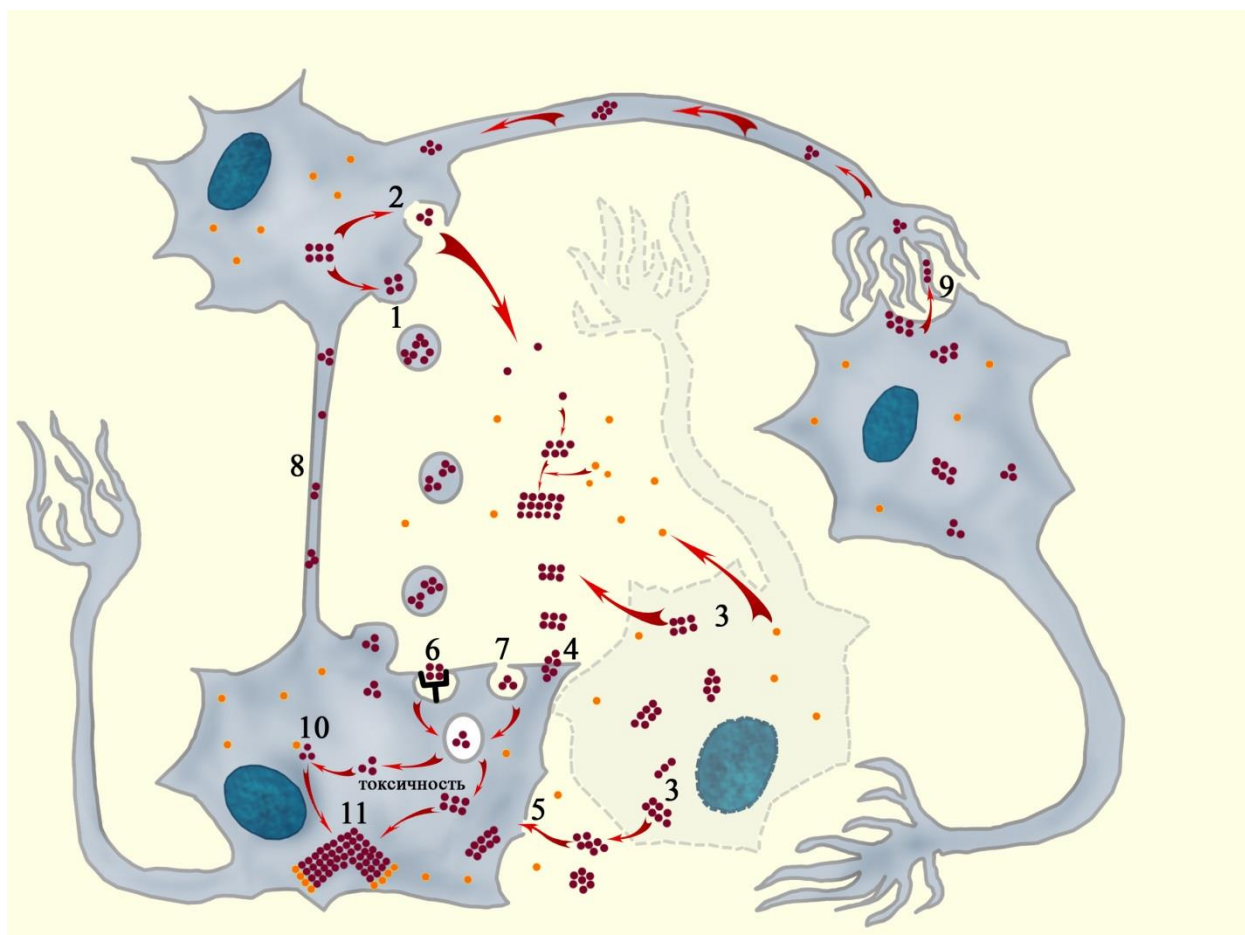


Рис. 4. Обобщённая схема возможных переносов патогенных белков при нейродегенеративных заболеваниях

Небольшое количество белковых агрегатов может высвобождаться во внеклеточное пространство внутри экзосом (1) или неокружёнными мембранными структурами через повреждённые мембраны (2). Также агрегаты и белки выходят из поврежденных клеток (3). Олигомеры и протофибриллы (красные) могут выступать в качестве «затравки», инициирующей агрегацию нативных растворимых белков (оранжевые), что может привести к образованию нерастворимых агрегатов и фибрилл. Белковые агрегаты могут проникать внутрь соседней клетки непосредственно через плазматическую мембрану (4) или в местах повреждения целостности мембраны (5) нейрона-реципиента. Также имеет место рецептор-опосредованный (6) или жидкостный (7) эндоцитоз. Также межклеточный перенос белков может происходить сквозь туннельные нанотрубки (8) или посредством транс-синаптических контактов (9).

Интернализированные агрегаты в дальнейшем могут вызвать агрегацию нативных белков нейрона-реципиента (10). В итоге могут образоваться токсичные формы белков, которые приводят к образованию патологических телец включения (11).

3.4. Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH, 3PDH Glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase, ГАФД, ГАФДГ) — фермент, имеющий молекулярную массу около 37 кДа, который катализирует шестой этап гликолиза. По недавним исследованиям, ГАФД также вовлечена в активацию транскрипции, инициацию апоптоза (Haass, Selkoe, 2007), транспорт в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи (Terlow et al, 2006).

Активная молекула ГАФД представляет собой тетрамер с общей молекулярной массой 145 кДа. Каждая субъединица содержит 331 остаток с молекулярной массой 35,9 кДа. Все четыре субъединицы О, Q, R, и P не зависят друг от друга, и каждая субъединица содержит коэнзим НАД⁺ (Sokolowski et al, 2003). Субъединицы О и Р состоят из 9 α -спиралей и 17 β -складчатых листов, субъединица Q состоит из 8 α -спиралей и 17 β -складчатых листов, а субъединица R состоит из 9 α -спиралей и 19 β -складчатых листов. Все четыре субъединицы содержат параллельные и анти-параллельные β -складчатые листы, окруженные слоем α -спиралей, как характерно для укладки Россмана (Biesecker et al, 1977).

Каждый мономер ГАФД состоит из двух доменов. Первый домен содержит остатки 0–148, которые участвуют в НАД⁺ связывании. Этот домен состоит из β - α - β модели с центральным β -складчатым слоем, покрытым с обеих сторон α -спиралями. Второй домен содержит боковые цепи с остатками 149–333, которые участвуют в катализе. Второй домен состоит из обширных β -складчатых антипараллельных листов. Этот домен также содержит S-образную петлю из полипептидных остатков 178–201, которые находятся в контакте с НАД⁺ на оси R. S-петля также взаимодействует с несколькими аминокислотами на оси (Biesecker et al, 1977).

Функция ГАФД в гликолизе заключается в том, что она катализирует превращение глицеральдегид-3-фосфата в D-глицерат-1,3-бисфосфат. Это

шестой шаг гликолитического распада глюкозы, происходящего в цитозоле эукариотических клеток. Преобразование происходит в два этапа.

На первом этапе происходит реакция окисления глицеральдегид-3-фосфата в первом положении углерода. В результате альдегид превращается в карбоновую кислоту и NAD^+ переходит в NADH .

Выделяемая при этой реакции окисления энергия используется на втором этапе, на котором молекула неорганического фосфата переносится на GAP с образованием 1,3-бифосфоглицерата (1,3-BPG) (рис.5) (Butterfield et al, 2010).

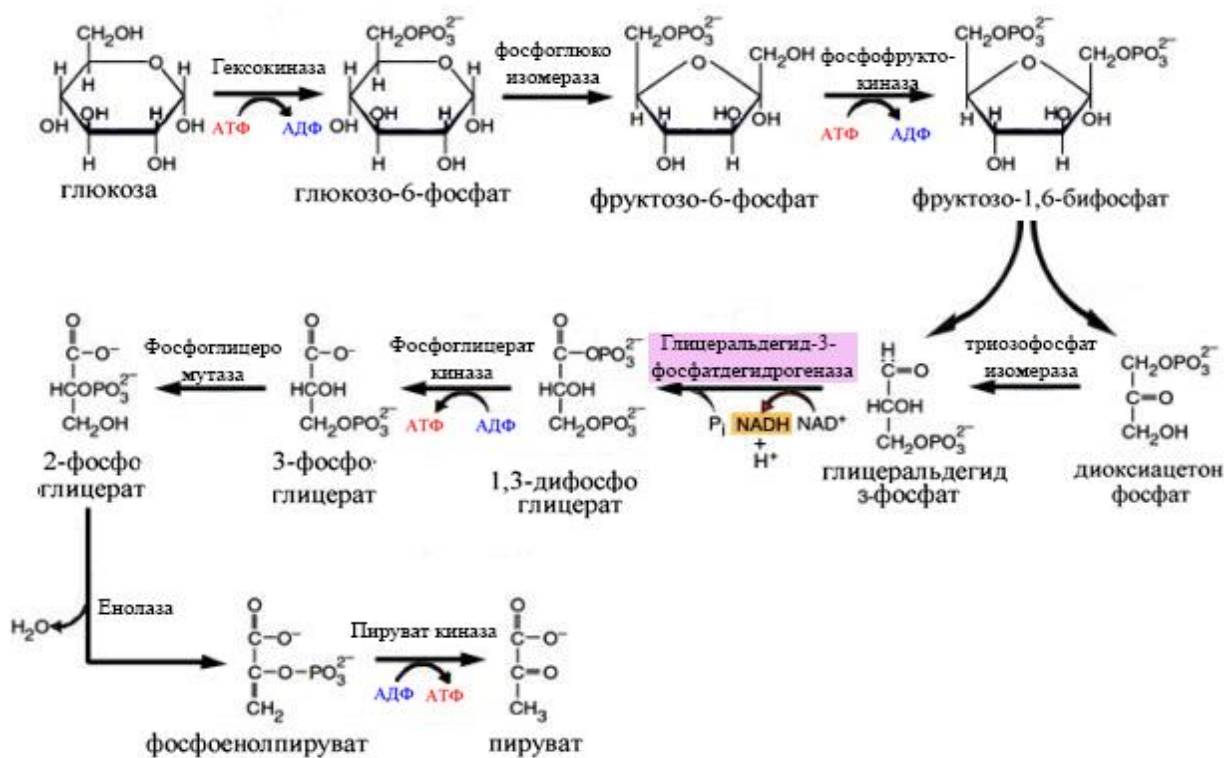


Рис. 5.Общаясхемагликолиза(Butterfield et al, 2010)

Помимо гликолиза, ГАФД участвует в разнообразных клеточных процессах, таких как восстановление ДНК (специфически взаимодействует с эндонуклеазой APE-1 и восстанавливает её в активную форму из окисленной) и защита ДНК (связывается с теломерными участками ДНК во время репликации) (Guijarro et al, 1998), экспорт тРНК, слияние мембран и

визуальный транспорт (Rab2-опосредованный транспорт из эндоплазматического ретикулума в аппарат Гольджи) и динамика цитоскелета (участвует в ассоциации мембранного и цитозольного тубулина при формировании сети микротрубочек в цитоплазме) (Sun et al, 2008). ГАФД, расположенная на поверхности макрофагов, может выполнять функцию рецептора трансферрина (Cobb et al, 2007).

Также ГАФД замечена в сигнальных клеточных каскадах: в качестве ко-активатора она взаимодействует с андрогенным рецептором (AR), образует комплекс ГАФД-АР и перемещает этот комплекс из цитоплазмы в ядро. При этом ГАФД усиливает транскрипционную активность АР (Tarze et al, 2007). Но, в тоже время, ГАФД участвует в предотвращении каспаза-независимой клеточной смерти при митохондриальных нарушениях (Zala et al, 2013).

При инактивации окислением или S-нитрозилированием тетрамерная молекула ГАФД может диссоциировать на димеры и мономеры, которые, в свою очередь, могут связывать некоторые полипептиды, такие как Siah1 убиквитинлигазы и транспортировать их в ядро (Skarzynsky et al, 1987). Этот комплекс воздействует на pR300/CBP транскрипционный фактор и активирует проапоптотические белки p53, PUMA, Bax и p21 (Biesecker et al, 1977). Было установлено, что экспрессия ГАФД повышается в митохондриях в условиях окислительного стресса, голодания клеток, радиационных повреждений и других стрессах.

Многофункциональные свойства ГАФД, вероятно, регулируются путем олигомеризации, обратимых и необратимых пост-трансляционных модификаций и субклеточной локализации. Окислительный стресс инициирует диссоциацию молекулы на мономеры с последующей олигомеризацией и агрегацией ГАФД через формирование межмолекулярных дисульфидных связей. Причем в этом процессе основную роль играет окисление цистеинов (Cys-149 и Cys-281 у кролика, Cys-152 — у человека) (Tisdale et al., 2004).

Нативная форма ГАФД, состоящая из четырех идентичных мономеров (О, Р, Q, и R), не имеет дисульфидных связей в своей структуре. Кроме того, цистеины в нативной форме не могут образовывать дисульфидные связи из-за пространственных ограничений, т.к. находятся на нижней части активного сайта ГАФД и слишком удалены друг от друга (Tisdale et al, 2004) (рис.6).

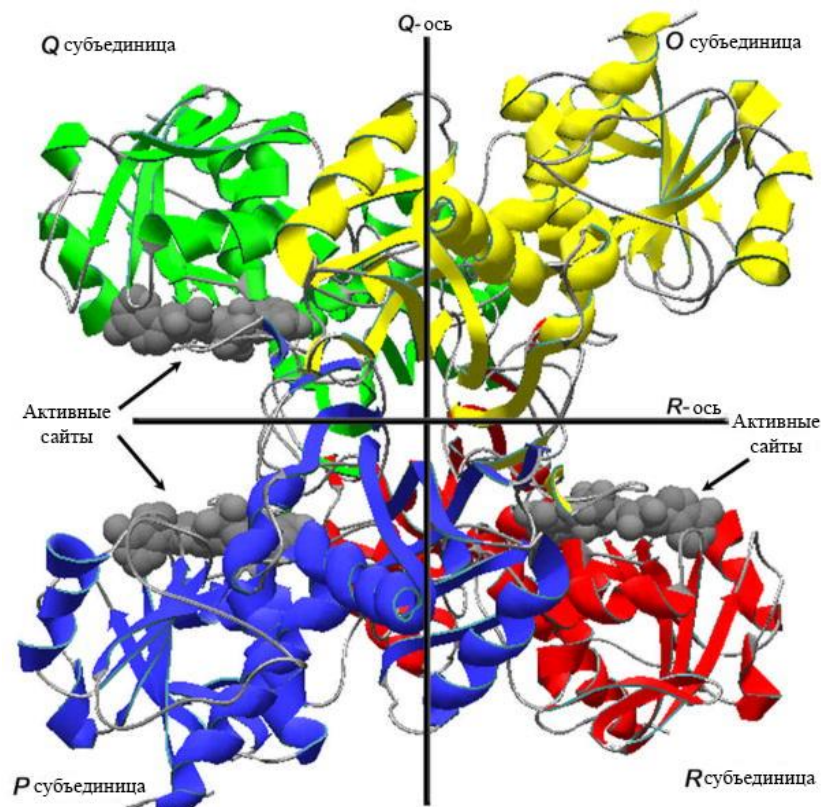


Рис. 6. Структура ГАФД

Разноцветными лентами показаны субъединицы О, Р, Q и R. Активные сайты расщепления обозначены стрелками на каждой из асимметричных субъединиц, Р, Q и R. Цветовой код: зеленый – субъединица Q; желтый – субъединица О; синий – субъединица Р; красный – субъединица R; Серый – магистральные петли углерода, обеспечивающие вторичную структуру; Серые молекулярные структуры – НАД (+). Данные были получены из банка данных RCSB по коду 1u8f.pdb, DOI: 10.1107 / S09074444905042289 (Jenkins and Tanner, 2006). Модель была разработана при помощи программы DeepView SwissPDBверсия 4.0.

При окислительном стрессе происходит изменение конформации ГАФД, доступ к другим цистеинам открывается, в результате чего в паре Cys-Cys образуется дисульфидная связь. Cys-Cys дисульфидная связь вызывает дальнейшие конформационные изменения, в результате чего в реакцию вовлекаются другие цистеины. Таким образом, ускоряется реакция

формирования дальнейших мультимерных олигомеров. Более того, избыточная экспрессия ГАФД и её накопление в клетке способствует ее агрегации (Tisdale et al., 2004).

Димеры и олигомеры могут выступать в качестве «семян» для сборки длинных полимеров и образовывать нерастворимые агрегаты. Стабильное олигомерное состояние ГАФД устойчиво к ДСН и имеет кросс- β -структуру. Агрегаты, богатые β -складчатыми структурами, образуют со временем нерастворимые фибриллы, которые токсичны для клеток (Tisdale et al., 2004).

Важно отметить, что ГАФД способствует токсичности патогенных полиглутаминовых белков, как показано на моделях болезни Хантингтона и атаксии-3 (Guzhova et al., 2011; Lazarev et al., 2013). Кроме того, денатурированная форма ГАФД может непосредственно взаимодействовать с амилоидогенными и полиглутаминовыми белками и образовывать совместные агрегаты ($A\beta$ и α -синуклеин) (Wang et al, 2005; Naletova et al, 2008; Muronetz et al, 2016). Кроме того, ГАФД увеличивает токсичность полиглутаминовых белков, как показано в моделях болезни Хантингтона и атаксии-3 (Guzhova et al., 2011; Lazarev et al., 2013), и способствует агрегации патогенных белков.

Исследования показывают, что ГАФД в растворе состоит из тетрамеров размером около 8 нм (Markossian et al, 2006). При низких концентрациях ($<0,1$ мг /мл) фермент диссоциирует в димеры, порождая агрегаты. Принято считать, что ГАФД может димеризоваться и агрегировать в ответ на различные клеточные факторы стресса: от активных форм кислорода до полипептидов с неправильной конформацией (Colell et al, 2009, Tristan, 2011). Тетрамеры и неактивные формы ГАФД могут участвовать в совместной агрегации с polyQ, увеличивая агрегацию в 3-6 раз. А в присутствии тTG агрегация увеличивается еще больше, что доказывает предположение о том, что фермент необходим для укрепления polyQ-ГАФД или мутантного СОД1-ГАФД комплексов (Lazarev et al, 2015).

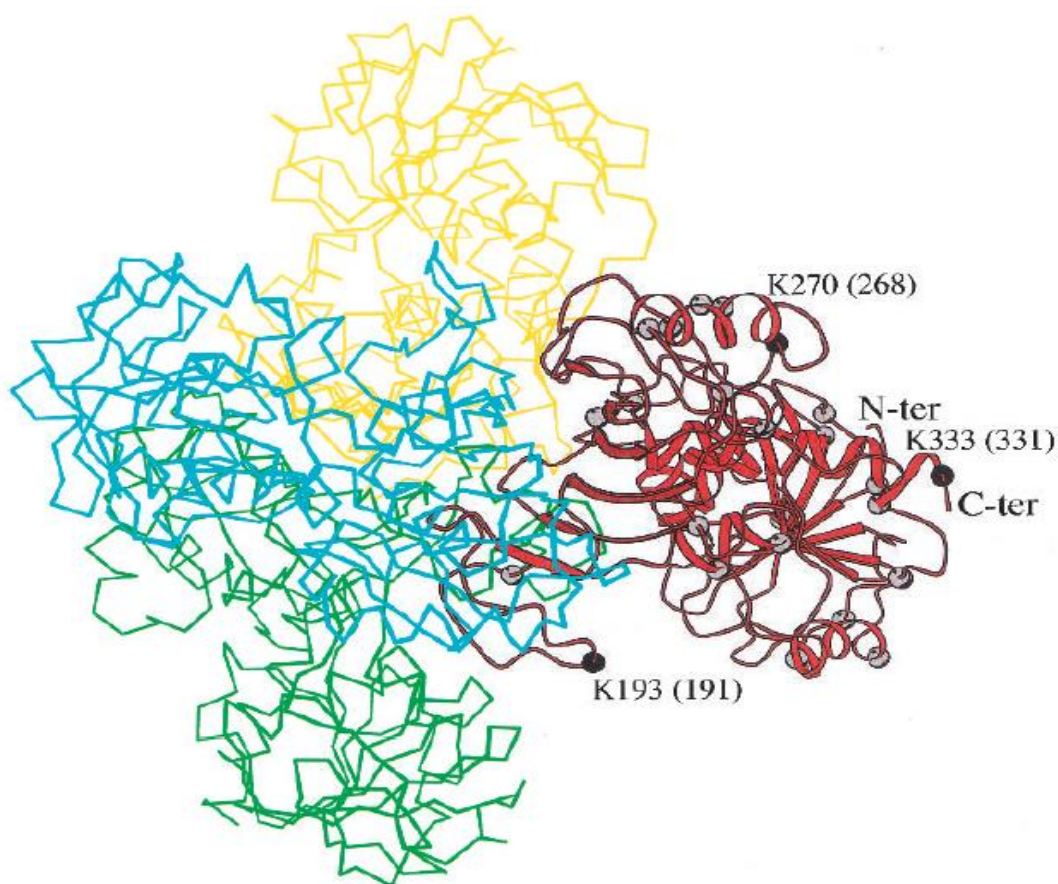


Рис.7. Тетрамер ГАФД (Mercer et al, 1976)

Разноцветными линиями на рисунке показаны субъединицы, шариками показано расположение остатков лизина. Чёрным цветом отмечены реактивные остатки лизина человеческой последовательности. В круглых скобках отмечены реактивные остатки лизина, соответствующие кроличьей последовательности. Модель ГАФД была разработана с использованием MOLSCRIPT (Kraulis, 1991).

Также показано, что биндеры ГАФД (например, гидроксиноненал) проявляют анти-агрегационный эффект: снижают размеры агрегатов патогенных белков и их общее содержание внутри клеток (Lazarev et al, 2015). В тоже время два из трех остатков лизина, K270 и K333, экспонированные на поверхности молекулы ГАФД, способны образовывать ковалентные связи с polyQ и с БТШ70 (рис. 7). Таким образом, БТШ70 специфически связывается с ГАФД и подавляет агрегацию polyQ путем уменьшения количества свободной ГАФД (Guzhova et al, 2011).

В заключение можно сказать, что ГАФД принимает активное участие в образовании агрегатов патогенных белков и способствует распространению нейродегенерации.

4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. Белки и пептиды

Рекомбинантные полипептиды, содержащие последовательность первого экзона хантингтина и 58 (мутантная форма) или 23 (дикий тип) остатков глутамина, выделяли из бактерий *E. coli*, трансформированных плазмидами pGEX-2TK-httQ58 или pGEX-2TK-httQ23 соответственно. Плазмиды были любезно предоставлены доктором Дж. Вэнг (Массачусетский центральный госпиталь, Бостон, США). Обе белковые конструкции, содержащие глутатион-S-трансферазные (GST) метки, очищали с помощью глутатион-сефарозной колонки (Qiagen, Германия). Элюцию белков производили после промывок геля с помощью раствора, содержащего 15 мМ глутатиона (Sigma, США), при pH 8.0.

ГАФД, выделенная из мышцы кролика, был любезно предоставлен проф. В.И. Муронцом (Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова).

В экспериментах с использованием проточной цитометрии использовали ГАФД, конъюгированную с флуоресцентным красителем Cy5, а в экспериментах конфокальной микроскопии – с красителем Alexa 488 (Invitrogen, США). Конъюгацию с красителями производили в соответствии с протоколом производителя.

4.2. Клеточные культуры и условия культивирования

Клетки нейробластомы человека SK-N-SH были любезно предоставлены проф. Д. Рубинштейном из Университета Кэмбриджа (Великобритания).

Клетки феохромоцитомы крысы PC-12 дикого типа были взяты из Российской коллекции клеточных культур (Россия, Санкт-Петербург). Клетки феохромоцитомы крысы PC-12HttQ103, несущие экдизон-индуцибельную генетическую конструкцию, включающую 1-ый экзон гена

хантингтина, слитого с геном зеленого флуоресцентного белка (Apostol et al., 2006), были любезно предоставлены проф. М. Шерманом из Бостонской Школы Медицины (США).

Для культивирования клеток использовали питательную среду DMEM (БиоЛот, Россия) с добавлением L-глутамина, 50 мкг/мл сульфата гентамицина и 10 % фетальной бычьей сыворотки (PAA LaboratoriesGE, Австрия). В среду для культивирования клеток PC-12HttQ103 также добавляли 100 мкг/мл G-418 (Gibco by Life Technologies, Великобритания). Культивирование клеток проводили при температуре 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Индукцию экспрессии HttQ103 в клетках PC-12HttQ103 вызывали добавлением в питательную среду 2 мкМ Понастерона А (Sigma, США).

Для оценки цитотоксичности кондиционированной среды, клетки PC-12HttQ103 с растущими агрегатами и контрольные клетки PC-12 дикого типа высевали в лунки 6-луночных планшетов (Sarstedt, Германия) в концентрации 200000 клеток/мл и культивировали в течение ночи. На следующее утро в питательную среду добавляли 2 мкМ Понастерона А (ПонА) и инкубировали клетки в течение следующих 3, 9, 24, 36 и 48 часов при 37°C. После инкубации клетки промывали три раза ФСБ и добавляли свежую бессывороточную среду на следующие 4 часа, в течение которых в среде накапливались белки, высвобождаемые из клеток. Кондиционированную среду собирали, добавляли к ней фетальную бычью сыворотку до конечной концентрации 10% и инкубировали с интактными клеткам PC-12HttQ103 или PC-12 дикого типа в течение 24 часов. В некоторых экспериментах агрегаты удаляли из кондиционированной среды при помощи центрифугирования (12000g, 15 мин) до инкубации с акцепторными клетками.

При приготовлении проб для конфокальной микроскопии, клетки SK-N-SH высевали на покровные стекла и инкубировали в течение ночи. Затем клетки трансфецировали плазмидой, содержащей ген 1-го экзона

хантингтина с 25 глутаминовыми остатками (непатогенная форма), слитый с зеленым флуоресцентным белком EGFP (любезно предоставлена проф. Д. Рубинштейном из Университета Кэмбриджа, Великобритания). Трансфекцию проводили с использованием Липофектамина 2000 (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Через четыре часа после трансфекции среду заменяли свежей средой, содержащей 10 мкг/мл Q58 или Q23 по отдельности или в комплексе с 10 или 30 мкг/мл ГАФД. Еще через 48 часов клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 20 мин, а ядра окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Готовые препараты сканировали с помощью конфокального лазерного микроскопа Leica TCS SL. Для возбуждения флуоресценции EGFP и DAPI применяли лазеры с длиной волны 488 нм и 450 нм соответственно. Анализ полученных изображений проводили с помощью программы Leica Application Suite 2.0.2 (Leica).

4.3. Ультрафильтрация: метод ловушки на фильтре

Кондиционированные среды клетками РС-12 дикого типа или РС-12 HttQ103, собранные после 3, 9, 24, 36 и 48 часов после введения ПонА (как описано выше), а также клеточные лизаты исследовали на наличие агрегатов.

Пробы кондиционированной среды или клеточных экстрактов смешивали с 2% раствором ДСН и вносили в лунки 96-луночного манифолда (BioRad, США), соединенным с вакуумным насосом. В качестве дна манифолда выступала ацетат-целлюлозная мембрана. Растворимые в ДСН клеточные белки проходили через поры мембраны, а нерастворимые белковые агрегаты задерживались на мембране.

Полученную мембрану инкубировали с антителами против polyQ (MAV1574, Millipore, Германия) или ГАФД (6C5, Abcam, Великобритания), а затем с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, США). Пероксидазную реакцию визуализировали при помощи метода усиленной хемилюминесценции. Интенсивность свечения определяли при помощи программы TotalLab Quant.

4.4. ГАФД иммуноферментный анализ

Количественный анализ ГАФД, находящейся в кондиционированной среде, проводили при помощи тест-системы на основе двухсайтового иммуноферментного анализа, разработанного в нашей лаборатории.

Для увеличения чувствительности метода в начале на твёрдой фазе адсорбировали NeutrAvidin (Sigma, США) в концентрации 4 мкг/мл в течение 1 часа и производили отмывку буфером ФСБТ от несвязавшихся компонентов. Свободные места связывания блокировали БСА в концентрации 5 мг/мл и производили отмывку. Затем вносили поликлональные крысиные антитела к ГАФД (получены в нашей лаборатории), предварительно меченные биотином (Pierce, США) в концентрации 5 мкг/мл и производили отмывку. После этого производили инкубацию с антигенами в течение 4 часов (калибровка стандартов чистой ГАФД в концентрациях 2 нг/мл, 6 нг/мл, 18 нг/мл и 54 нг/мл, и разбавленная в 2 раза кондиционированная среда клетками РС-12HttQ103 и РС-12 дикого типа после воздействия ПонА). После процедуры отмывания в лунки вносили моноклональные мышинные антитела к ГАФД (6C5, Abcam, Великобритания) и инкубировали в течение 1 часа. После очередной отмывки вносили вторичные моноклональные конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к лёгким и тяжёлым цепям мышинных иммуноглобулинов (Jackson ImmunoResearch, США) и инкубировали в течение 1 часа. После отмывки добавляли смесь цитратного буфера с 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (Sigma, St.Louis, США). Реакцию останавливали через 15 мин 1 М серной кислотой, и количество продукта реакции измеряли с помощью иммунохимического анализатора «Флюорофот» (ПРОБАНАУЧПРИБОР, Россия) при длине волны, равной 450 нм. Количество ГАФД в образцах определяли с использованием калибровочной кривой (2–54 нг/мл), полученной из титров стандартов.

4.5. Проточная цитометрия

Для количественной оценки степени внутриклеточного транспорта ГАФД клетки SK-N-SH инкубировали с 66 мкг/мл ГАФД, меченной $Cy5$, в течение 15, 30 мин и 1, 3 и 6 часов. Затем клетки тщательно промывали ФСБ и анализировали с помощью проточного цитометра BDFACSAria3 (Becton Dickinson, США) при длине волны, равной 655 нм.

4.6. Клеточный иммуноферментный анализ

Клеточный иммуноферментный анализ использовали в качестве альтернативного метода оценки внутриклеточного транспорта polyQ и ГАФД и их динамики. Клетки SK-N-SH рассеивали на 96-ти луночный планшет в концентрации 200000 клеток/мл. После 18 часов инкубации клетки подвергали воздействию ГАФД (30 мкг/мл), Q23 (10 мкг/мл), Q58 (5 или 10 мкг/мл) в течение 15, 30 мин, 1, 3, 6 или 18 ч. После клетки отмывали буфером ФСБТ и фиксировали 4% формалином (Sigma, США). После отмывки клетки подвергали воздействию 0,3% перекиси водорода (Sigma, США) в течение 30 мин. После отмывки добавляли антитела к антигенам: моноклональные мышиные к ГАФД (6C5, Abcam, Великобритания) или моноклональные мышиные к polyQ (Millipore MAB 1574, Германия) и инкубировали в течение часа. После очередной отмывки вносили конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела к лёгким и тяжёлым цепям мышиных иммуноглобулинов (Jackson Immuno research, США) и инкубировали в течение 1 часа. После отмывки добавляли смесь цитратного буфера с 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (Sigma, St.Louis, США). Реакцию останавливали через 15 мин 1 М серной кислотой.

При ингибиторном анализе внутриклеточного белкового транспорта клетки SK-N-SH инкубировали с 30 мкг/мл ГАФД, смешанного с 10 мкг/мл Q23 или Q58 в присутствии 100 мкМ динасора (ингибитор динамин-зависимого эндоцитоза); 10 мкМ хлорпромазина (ингибитор клатрин-

зависимого эндоцитоза); 50 мкМ амилорида (ингибитор пиноцитоза); 10 мкМ филипина (ингибитор кавеолин-зависимого эндоцитоза); 5 мкМ цитохалазина D (нарушает актин-зависимый транспорт); 2 мкМ нокодазола (ингибитор тубулин-зависимого эндоцитоза); 5 мкМ метил-бета-циклодекстрина (M β CD) (разрушает липидные рафты). После 6-часовой инкубации клетки обрабатывали по вышеописанному протоколу.

Количество продукта реакции измеряли с помощью иммунохимического анализатора «Флюорофот» (ПРОБАНАУЧПРИБОР, Россия) при длине волны, равной 450 нм.

4.7. Определение активности дегидрогеназ по Мосману

Жизнеспособность клеток оценивалась при помощи метода Мосмана (Mosmann, 1983). Данный метод основан на способности живых клеток восстанавливать соли тетразолия МТТ. В лунки 96-луночного планшета вносили по 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл), и клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO₂. Затем в лунки планшета вносили по 100 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана и измеряли сигнал при длинах волн 570 нм и 630 нм на иммунохимическом анализаторе «Флюорофот» (ПРОБАНАУЧПРИБОР). Результатом служила разница между значениями поглощения, полученными при 570 нм и 630 нм.

4.8. Определение активности лактатдегидрогеназы

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) является стабильным цитозольным ферментом. При повреждении клеточной мембраны (клеточный лизис или некроз) ЛДГ высвобождается во внеклеточное пространство. Таким образом, по активности ЛДГ в клеточной среде можно судить о количестве погибших клеток. Активность ЛДГ определяли колориметрическим методом с использованием набора CytoTox 96 фирмы Promega (США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию ЛДГ в культуральной среде измеряли в ферментативном тесте при превращении

солей тетразолия в цветные продукты формазана. Оптическую плотность измеряли на иммунохимическом анализаторе «Флюорофот» (ПРОБАНАУЧПРИБОР) при длине волны, равной 490 нм.

4.9. ПААГ-ДСН электрофорез и иммуноблоттинг

При приготовлении проб клетки собирали, промывали холодным ФСБ, центрифугировали при 800 g в течение 5 мин. К сухому клеточному осадку добавляли лизирующий буфер (20 мМ Трис-HCl pH 7,5; 150 мМ NaCl; 0,5 % Тритон X-100; 2 мМ ЭДТА). Электрофоретическое разделение белков проводили по методу Лаэммли (Laemmli, 1970) в 10 %-ном ПААГ.

Перенос разделенных белковых зон из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Immobilon-P (PVDF), размер пор 0,45 мкм, фирмы Millipore Corporation) производили при помощи камеры MINI-Protean TETRA (BioRad, США).

Зоны интересующих белков выявляли с использованием первичных моноклональных антител и вторичных антител против иммуноглобулина (IgG) мыши, меченных пероксидазой хрена. Пероксидазную реакцию визуализировали при помощи метода усиленной хемилюминесценции.

Для окрашивания белковых зон использовали антитела: моноклональные мышинные против ГАФД, клон 6C5, титр 1:5000 (Abcam), антитела против иммуноглобулина (IgG) мыши, меченные пероксидазой (фирмы Sigma, титр 1:10000).

4.10. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с помощью компьютерной программы Excel (Microsoft) с использованием t-критерия Стьюдента. Полученные значения представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего. Разницу считали статистически значимой при $p < 0,05$ (*) или $p < 0,01$ (**).

5. РЕЗУЛЬТАТЫ

5.1. ГАФД и polyQ высвобождаются из клеток, индуцированных к экспрессии НТТQ103

ГАФД стимулирует формирование цитотоксических агрегатов polyQ в модели БХ *in vitro* и в модели атаксии-3 *in vivo* (Guzhova et al, 2011; Lazarev et al, 2015). Мы предположили, что эти агрегаты способны мигрировать из патогенных клеток в другие регионы мозга подобно прионным белкам. Чтобы подтвердить роль ГАФД во внеклеточном транспорте polyQ, мы использовали клетки феохромоцитомы крысы РС-12, несущие экдизон-индуцибельную генетическую конструкцию, включающую 1-ый экзон гена НТТ, содержащего 103 глутаминовых повтора (Q103), РС12-HttQ103 (Apostol et al, 2006).

После добавления в культуральную среду Пона начиналась экспрессия Q103. В первые часы после инициации экспрессии мутантный белок был расположен в цитоплазме диффузно, но уже через 9 часов начали появляться первые агрегаты; через 24 ч 50% клеток содержали агрегаты polyQ, а через 48 ч агрегаты находили уже в 100% клеток (Рис. 8).

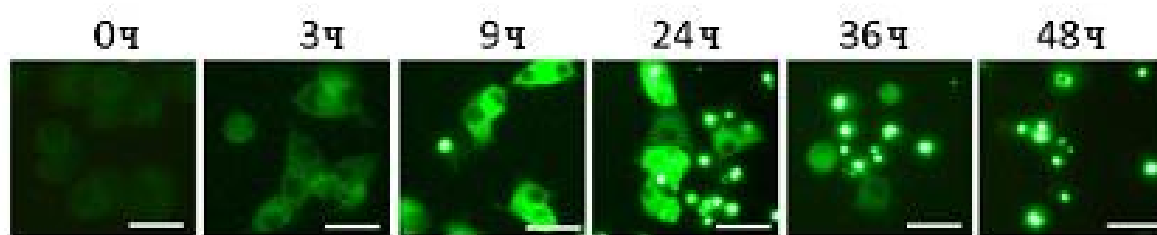


Рис.8. Клетки РС12-HttQ103. Экспрессию патогенного белка polyQ вызывали добавлением в среду 2 мкМ Пона в течение указанных периодов времени.

Масштабная линейка: 10 мкм.

Как и ожидалось, в состав агрегатов polyQ входила ГАФД, что было подтверждено с помощью метода конфокальной микроскопии (Рис.9).

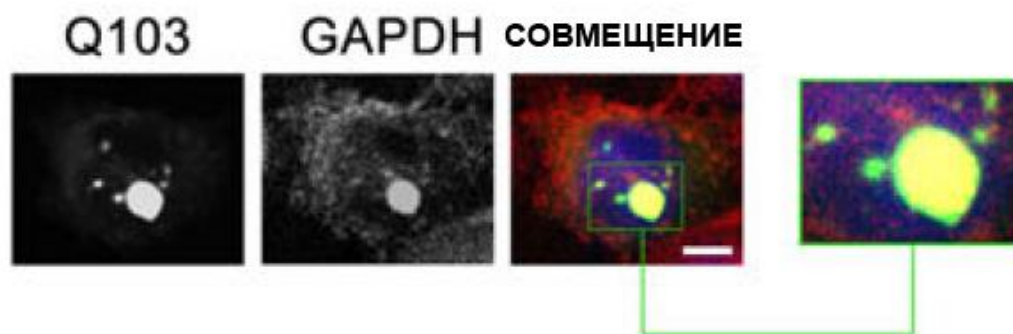


Рис.9. Колоколизация ГАФД и polyQ в клетках PC12-HttQ103 через 24 часа после индукции экспрессии Q103 с помощью ПонА.

Чтобы понять, вызывают ли агрегаты polyQ, растущие внутри клеток, клеточную смерть, мы использовали методы (1) определения жизнеспособности с помощью МТТ, (2) исключения трипанового синего и (3) метод измерения активности внутриклеточного фермента лактат-дегидрогеназы в культуральной среде. Результаты всех трех тестов совпадали между собой, поэтому в дальнейшем для определения жизнеспособности клеток мы использовали метод МТТ. Количество мертвых клеток PC12-HttQ103 росло со временем. Через 48 часов после индукции клеток PC-12HttQ103 с ПонА, когда все клетки содержали агрегаты, процент умерших клеток достигал $53,5 \pm 4,2\%$ (рис.10, А). Контрольные клетки PC-12 дикого типа также продемонстрировали слабую чувствительность к ПонА. Их смертность составила $9,8 \pm 1,4\%$ через 48 часов инкубации с ПонА.

Поскольку мы обнаружили в среде ЛДГ, а её активность и количество росли по мере роста полиглутаминовых агрегатов, мы предположили, что и внутриклеточная ГАФД также может оказаться во внеклеточном пространстве. Чтобы подтвердить это, мы использовали двухсайтовый иммуноферментный анализ количества ГАФД с чувствительностью 2–5 нг/мл. Мы обнаружили ГАФД в культуральной среде уже через 3 часа после обработки клеток ПонА, а через 48 часов содержание фермента в среде

достигло 130 нг/мл (рис.10, Б). Иммуноблоттинг кондиционированной среды клетками PC-12 HttQ103 подтвердил постепенное повышение содержания ГАФД во внеклеточном пространстве с течением времени (рис. 10, Б, верхняя панель).

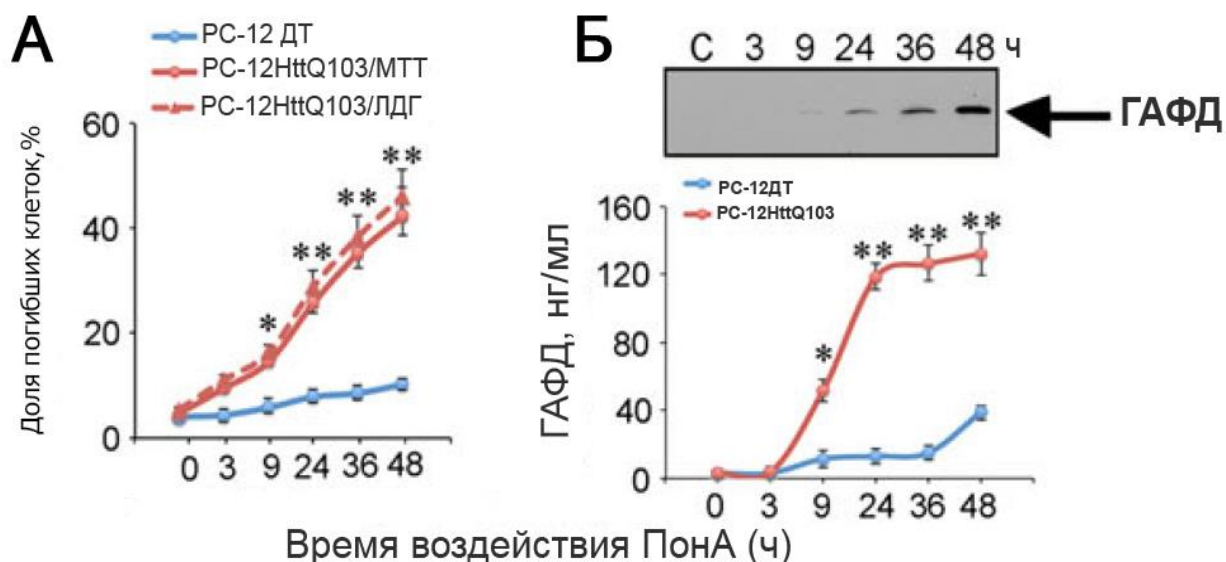


Рис.10. Жизнеспособность клеток и количество ГАФД в кондиционированной среде клетками PC-12HttQ103.

- А. Жизнеспособность клеток PC-12HttQ103 и PC-12 дикого типа (ДТ) после индукции с Пона, измеренная при помощи метода МТТ (непрерывная линия) и анализа активности ЛДГ (пунктирная линия).
- Б. Иммуноблоттинг кондиционированной среды клетками PC-12HttQ103 (антитела против ГАФД) и количество внеклеточной ГАФД в культуральной среде, измеренное при помощи двухсайтового ИФА.

Чтобы понять, в какой форме, свободной или агрегированной, ГАФД и polyQ находятся в культуральной среде клеток PC-12HttQ103, обработанных Пона, мы использовали метод ультрафильтрации в 96-луночном манифолде, позволяющий выявить нерастворимые в ДСН агрегаты. Образцы кондиционированной среды, отобранные в указанные промежутки времени после индукции клеток PC12-HttQ103 Пона, в буфере, содержащем 2% ДСН, вносили в лунки манифолда в триплах. В результате мы получили 2 идентичные мембраны, одну из которых окрашивали антителами против

ГАФД, а другую – антителами против polyQ. Оба антитела окрашивали одни и те же точки. В опытах с чистыми белками мы показали, что ГАФД и Q58, смешанные в пробирке, формировали комплексы (Lazarev et al., 2015), что позволяет предположить, что и в культуральной среде они могут сформировать комплексы. Важно отметить, что интенсивность окрашивания антителами обоих белков постепенно усиливалась со временем, что даёт основание предположить, что накопление polyQ-ГАФД комплексов во внеклеточной среде также связано с повреждёнными клетками, производящими большее количество агрегатов (рис. 11).

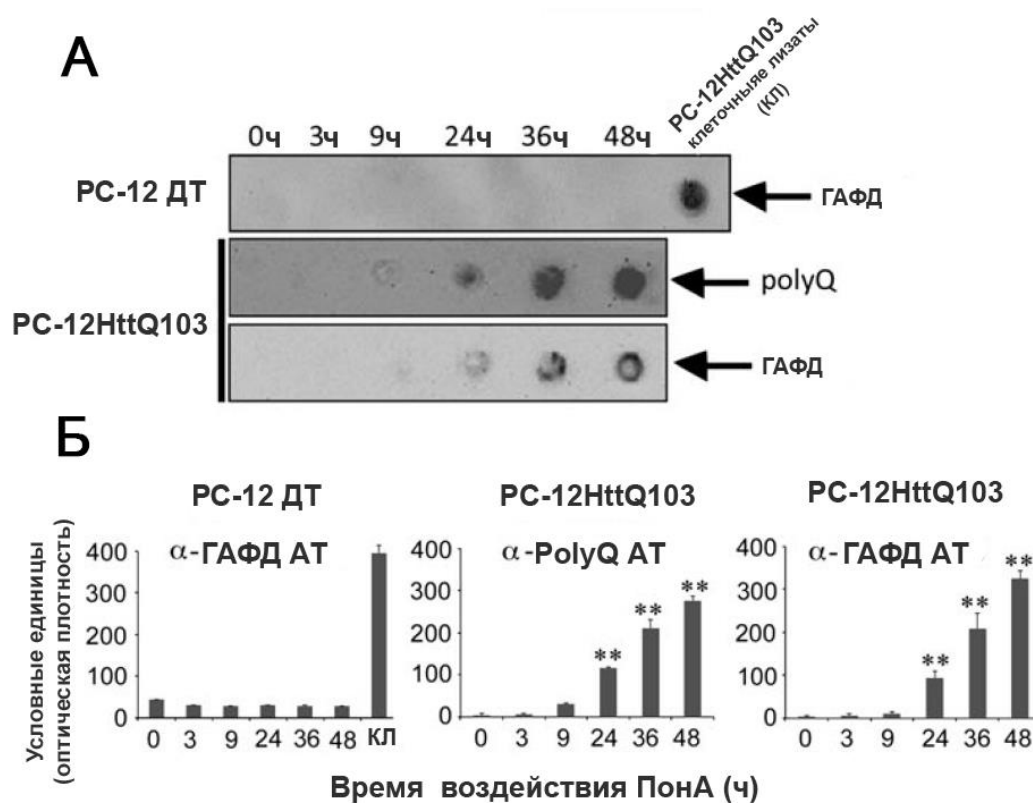


Рис.11. Анализ кондиционированной среды клетками PC-12HttQ103, обработанных Пона в течение указанных периодов времени.

- А. Ультрафильтрация и окрашивание полученных мембран антителами против polyQ и ГАФД.
- Б. Измерение уровня сигнала при помощи программы TotalLabQuant.

Чтобы понять, являются ли агрегаты PolyQ-ГАФД токсичными для интактных клеток, мы использовали кондиционированную среду от клеток

РС-12HttQ103 и клеток РС-12 дикого типа, инкубированных с ПонаА в течение разных периодов времени.

После индукции с ПонаА клетки промывали, затем к ним добавляли свежую среду без сыворотки и инкубировали в течение 4 часов. Затем среду собирали, добавляли к ней сыворотку до конечной концентрации 10% и переносили к интактным клеткам РС-12HttQ103 и РС-12 дикого типа. Спустя 48 часов определяли жизнеспособность клеток с помощью метода МТТ.

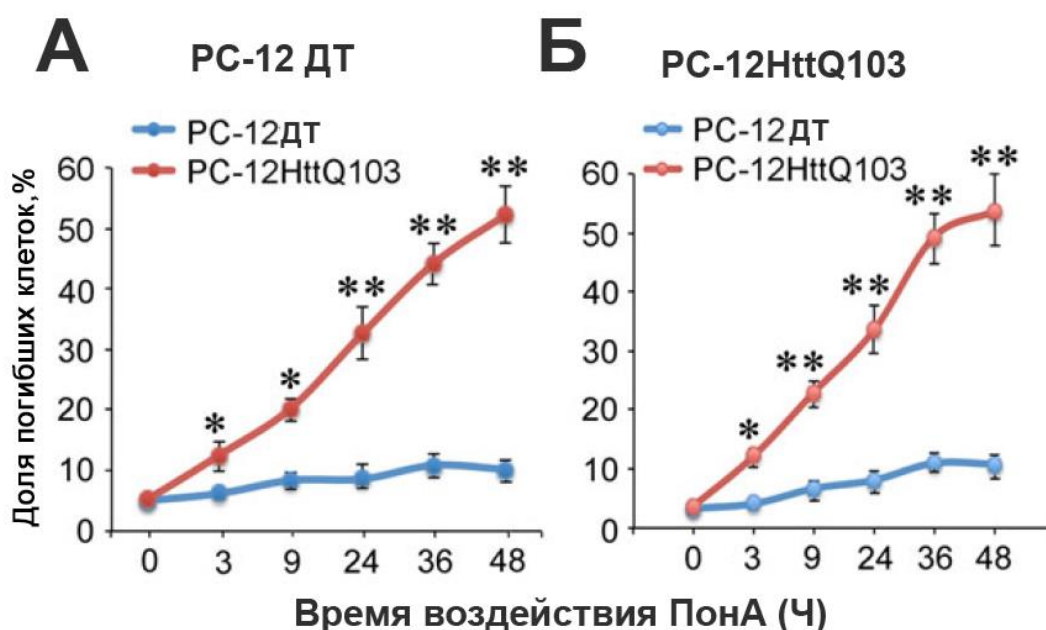


Рис.12. Токсичность культуральной среды, опосредованная наличием в ней агрегатов. Инкубация кондиционированной среды от клеток РС-12HttQ103, индуцированных ПонаА, с интактными клетками РС-12 дикого типа (А) и РС-12HttQ103 (Б).

Кондиционированная среда из-под клеток, в которых была индуцирована экспрессия патогенного белка, демонстрирует цитотоксические свойства в отличие от кондиционированной среды из-под клеток, в которых не была индуцирована экспрессия патогенного белка.

Было установлено, что кондиционированная среда становится токсичной для интактных клеток РС-12HttQ103 и РС-12 дикого типа после 24 часовой индукции ПонаА первичной культуры. При инкубации интактных клеток РС-12HttQ103 и РС-12 дикого типа с 48 часовой кондиционированной средой, цитотоксичность достигала $56,3 \pm 5,4\%$ и $56,4 \pm 6,4\%$ соответственно (рис. 12). В то же время кондиционированная среда из-под клеток РС-12

дикого типа не вызывала какого-либо заметного повышения клеточной смертности за тот же период времени (рис. 12).

Мы предположили, что цитотоксичность среды обусловлена наличием в ней внеклеточных polyQ-ГАФД агрегатов. Чтобы проверить эту гипотезу, мы удалили внеклеточные агрегаты polyQ-ГАФД из кондиционированной среды с помощью центрифугирования. Ультрафильтрация кондиционированной среды после центрифугирования не выявила наличия агрегатов, можно было наблюдать только следовые количества polyQ и ГАФД (рис. 13).

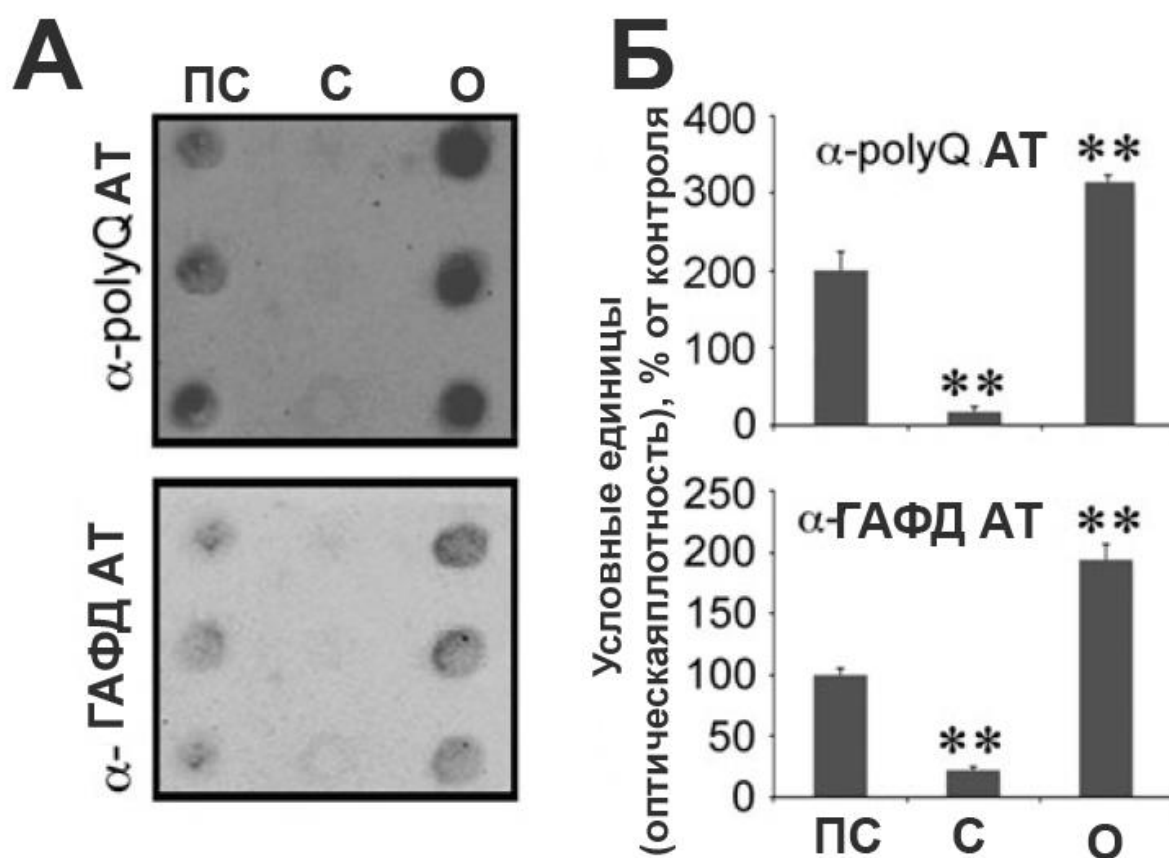


Рис. 13. Удаление агрегатов polyQ и ГАФД из кондиционированной среды. Кондиционированную среду клетками РС-12HttQ103 собирали и центрифугировали.

А. Измерение количества агрегированных polyQ и ГАФД в полной среде (ПС), во фракции супернатанта (С) и фракции осадка (О) с помощью метода ультрафильтрации.

Б. Измерение уровня сигнала при помощи программы TotalLabQuant.

Инкубация интактных клеток РС-12HttQ103 с 48 часовой кондиционированной средой из-под клеток РС-12HttQ103, индуцированных

к экспрессии Q103 ПонА, после удаления агрегатов (фракция С) не привела к гибели клеток по сравнению с клетками, инкубированными с полной кондиционированной средой (ПС). Фракция же, содержащая осадки с клеточными агрегатами после центрифугирования (фракция О), напротив, вызвала гибель большего числа (рис. 14).

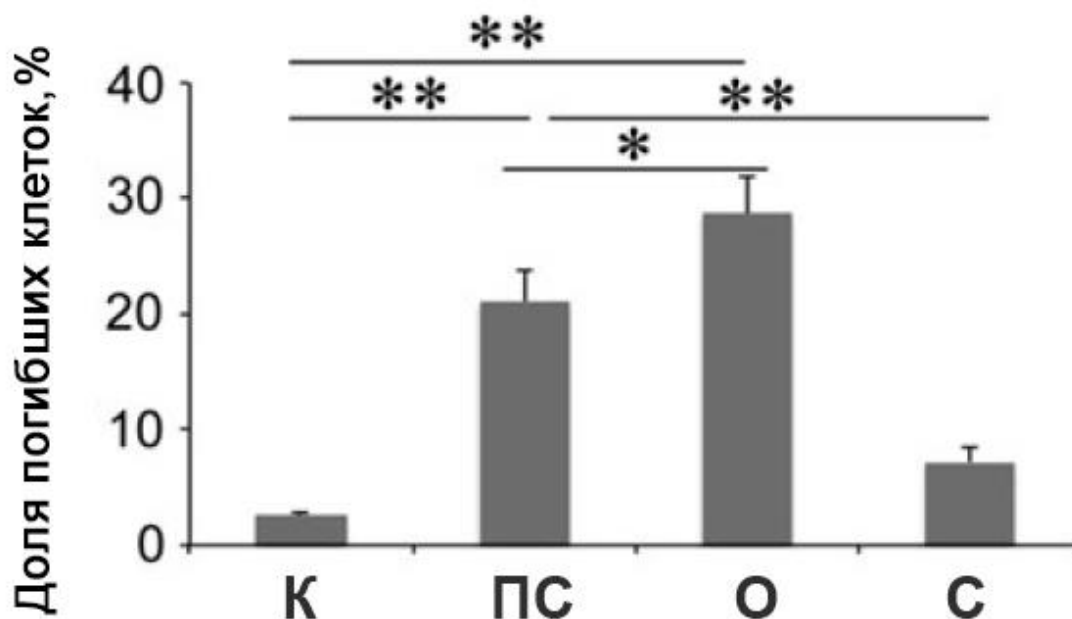


Рис.14. Жизнеспособность интактных клеток PC-12HttQ103 после инкубации в течение 48 часов с фракциями среды, полученных после центрифугирования: полная среда (ПС), фракция осадка (О) и фракция супернатанта (С). В качестве контроля (К) использовали кондиционированную среду интактными клетками. Статистическая значимость $p < 0,05$ (*) или $p < 0,01$ (**).

Полученные результаты позволяют нам сделать вывод, что внеклеточные агрегаты PolyQ-ГАФД являются токсичными для интактных клеток PC-12. Чтобы понять, какой из компонентов комплекса проявляет большую цитотоксичность, polyQ или ГАФД, мы использовали клетки нейробластомы человека SK-N-SH, которые инкубировали с чистыми белками, рекомбинантным Q58 в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/мл, и ГАФД в концентрациях 10 и 30 мкг/мл, в комплексе или по отдельности. Жизнеспособность определяли с помощью метода МТТ.

Чистый белок Q58 демонстрировал невысокую цитотоксичность и при концентрации 20 мкг/мл достигал максимального значения токсичности в $13,3 \pm 1,42\%$ (рис. 15). Цитотоксичность чистой ГАФД была выше и достигала $15,2 \pm 2,34\%$ в наибольшей концентрации 30 мкг/мл. Комплексы же Q58-ГАФД значительно и дозозависимо увеличили клеточную гибель до $33,3 \pm 2,96\%$ после 48-часовой инкубации в присутствии 20 мкг/мл Q58 и 30 мкг/мл ГАФД. Интересно, что фрагмент 1 экзона НТТ, содержащий 23 полиглутаминовых остатка, Q23, т.е. нормальный, непатогенный аналог Q58, не вызывал гибели клеток (рис. 15).

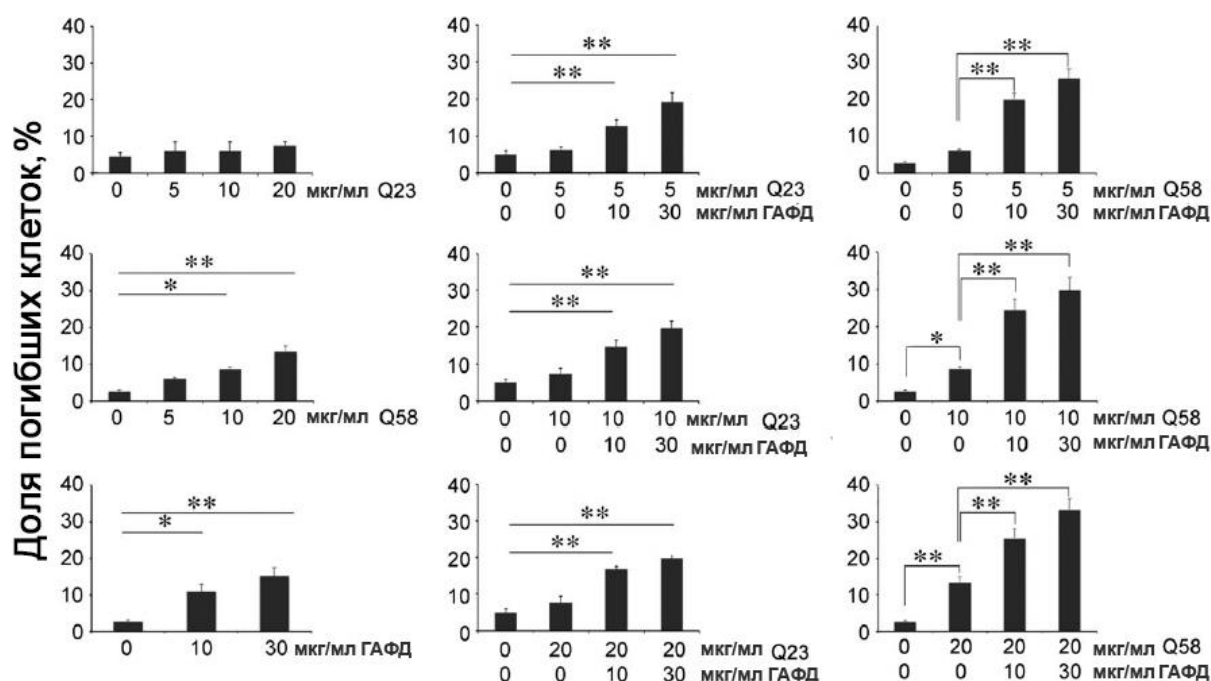


Рис.15. ГАФД усиливает токсичность polyQ в клетках SK-N-SH.

Клетки SK-N-SH высевали в лунки 96-луночных планшетов и инкубировали с Q23, Q58 и ГАФД в комплексе или по отдельности в указанных концентрациях. Через 48 часов измеряли жизнеспособность клеток. Представлены данные одного из трех репрезентативных экспериментов.

Статистическая значимость * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Данные этих экспериментов указывают на то, что, находясь во внеклеточной среде, ГАФД значительно увеличивает цитотоксический эффект polyQ с аномально длиной полиглутаминовой последовательностью.

5.2. ГАФД способствует прион-подобному поведению Q58 в нормальных клетках

Впервые прион-подобные свойства белков, имеющих полиглутаминовый тракт, были продемонстрированы в экспериментах, когда агрегаты синтетического пептида K2Q44K2 вводили в культуру клеток COS7 (Ren et al, 2009). Агрегаты входили в клетки и влияли на конформацию нормального НТТ.

Для того чтобы определить, обладает ли свойством ГАФД проникать в живые клетки или влиять на проникающую способность polyQ, мы исследовали поведение ГАФД в культуре клеток SK-N-SH. Предварительно мы метили ГАФД флуоресцентным красителем Cy5. Клетки инкубировали с ГАФД-Cy5 в течение 0,5, 3, 6, 12 и 24 часов, а затем анализировали при помощи метода проточной цитометрии. ГАФД появилась в клетках уже через 0,5 часа после добавления меченого фермента, его количество возрастало со временем и достигало плато в течение 6 часов (рис. 16). На основании этих результатов мы ограничили время наблюдения в дальнейших экспериментах до 6 часов.

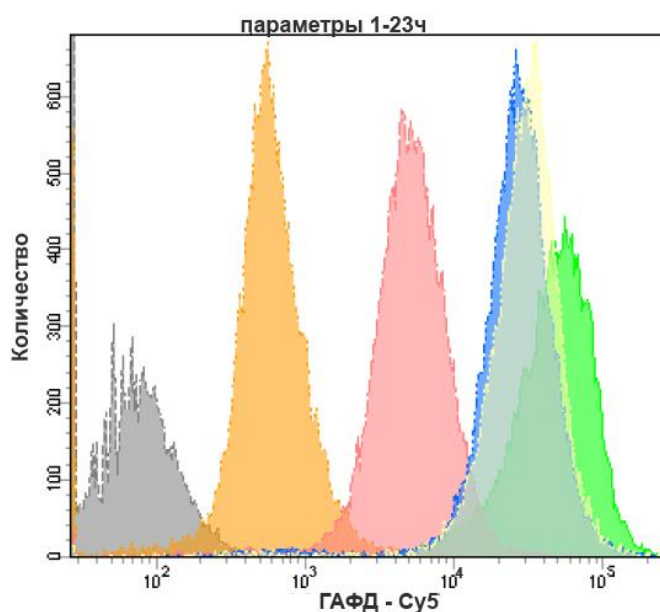


Рис.16. Клетки SK-N-SH высевали в лунки 6-луночных планшетов и инкубировали с 66 мкг/мл ГАФД, меченной красителем Cy5. Через 0,5ч (оранжевый), 1ч (красный), 3ч (синий), 6ч (желтый) и 24ч (зеленый), клетки промывали и анализировали с помощью метода проточной цитометрии. Контрольные клетки (серый) не инкубировали с ГАФД.

Чтобы понять, какую роль вносит ГАФД во внутриклеточный транспорт polyQ, мы изучили способность фермента и polyQ проникать в клетки по отдельности или в комплексе друг с другом с помощью клеточного ИФА. Клетки SK-N-SH сеяли в лунки 96-луночных планшетов, и, после того, как они прикреплялись, вносили очищенные рекомбинантные пептиды polyQ, Q58 (патогенная форма), Q23 (непатогенная форма) и ГАФД по отдельности или в комплексах. После тщательной отмывки, фиксации и пермеабелизации клетки окрашивали антителами против polyQ или против ГАФД. Сигнал, полученный от окрашивания внутриклеточного фермента, принимали за фоновое значение и вычитали из полученных сигналов. С течением времени количество поглощённой клетками ГАФД увеличивалось независимо от того, был ли он добавлен к культуре клеток отдельно или в комплексе с Q23 или Q58. Интересно, что непатогенный Q23 показал способность самостоятельно проникать внутрь клетки, в то время как патогенный Q58 сам по себе обладает очень низкой проникающей способностью. Когда же Q58 вносили клеткам в комбинации с ГАФД, его количество в клетках значительно возрастало, что было выявлено с помощью антител к polyQ; при анализе же вхождения комплекса с помощью антител к ГАФД выяснилось, что скорость и интенсивность его вхождения совпадает со скоростью и интенсивностью вхождения самой ГАФД (рис. 17).

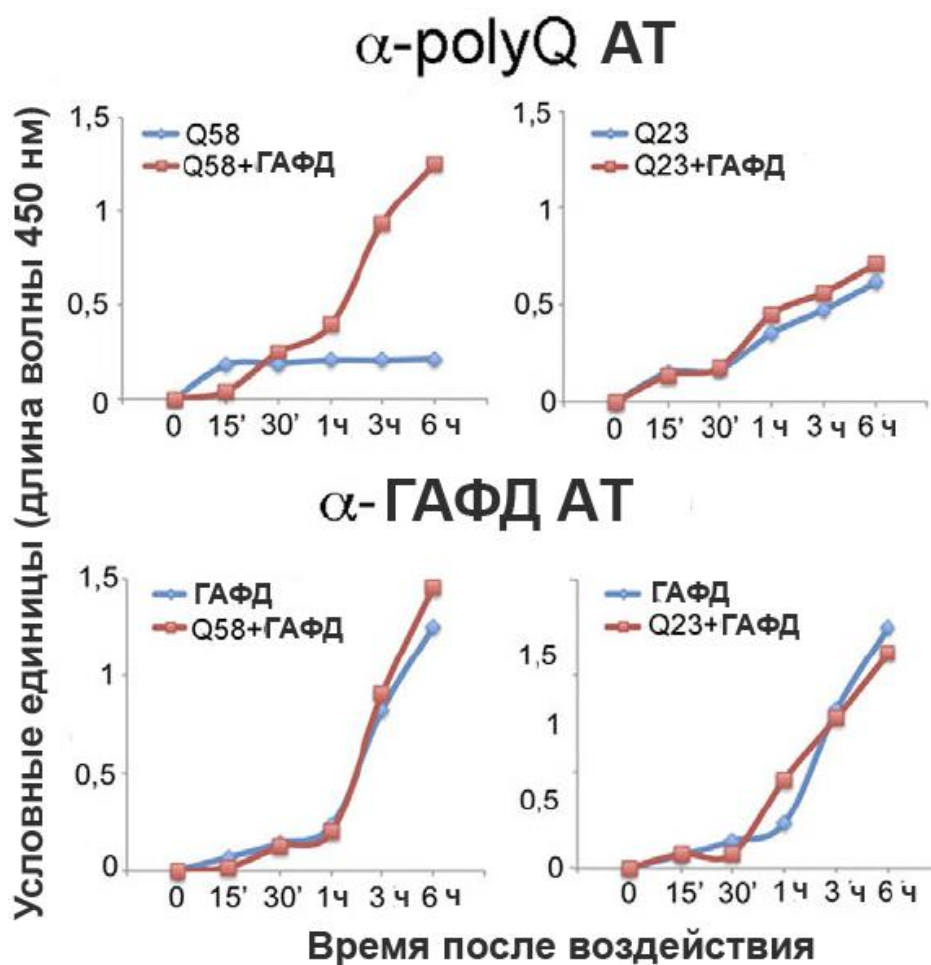


Рис.17. Изучение проникающей способности ГАФД и polyQ.

Клетки SK-N-SH инкубировали с Q23, Q58 и ГАФД по отдельности или в комплексе в течение указанных периодов времени. Затем клетки промывали, фиксировали, пермеабелизировали и анализировали с помощью метода клеточного ИФА с использованием антител против polyQ (верхняя панель) или против ГАФД (нижняя панель).

Для подтверждения данных, полученных с помощью метода клеточного ИФА, и для того, чтобы подтвердить вхождение комплексов polyQ-ГАФД внутрь клетки и исключить возможность налипания одиночных белков или комплексов polyQ-ГАФД на поверхность клеток, мы использовали метод конфокальной микроскопии. Мы использовали ГАФД, меченную Alexa-488. Через 6 ч после введения белков в культуральную среду, клетки фиксировали, пермеализовали и инкубировали с антителами против polyQ и вторичными антителами, конъюгированными с Alexa-555. Мы обнаружили, что ГАФД и Q58 распределяются внутри клеток SK-N-SH,

преимущественно в цитоплазме. Кроме того, как видно на рис.18, белки объединяются в комплексы и формируют агрегаты (рис. 18).

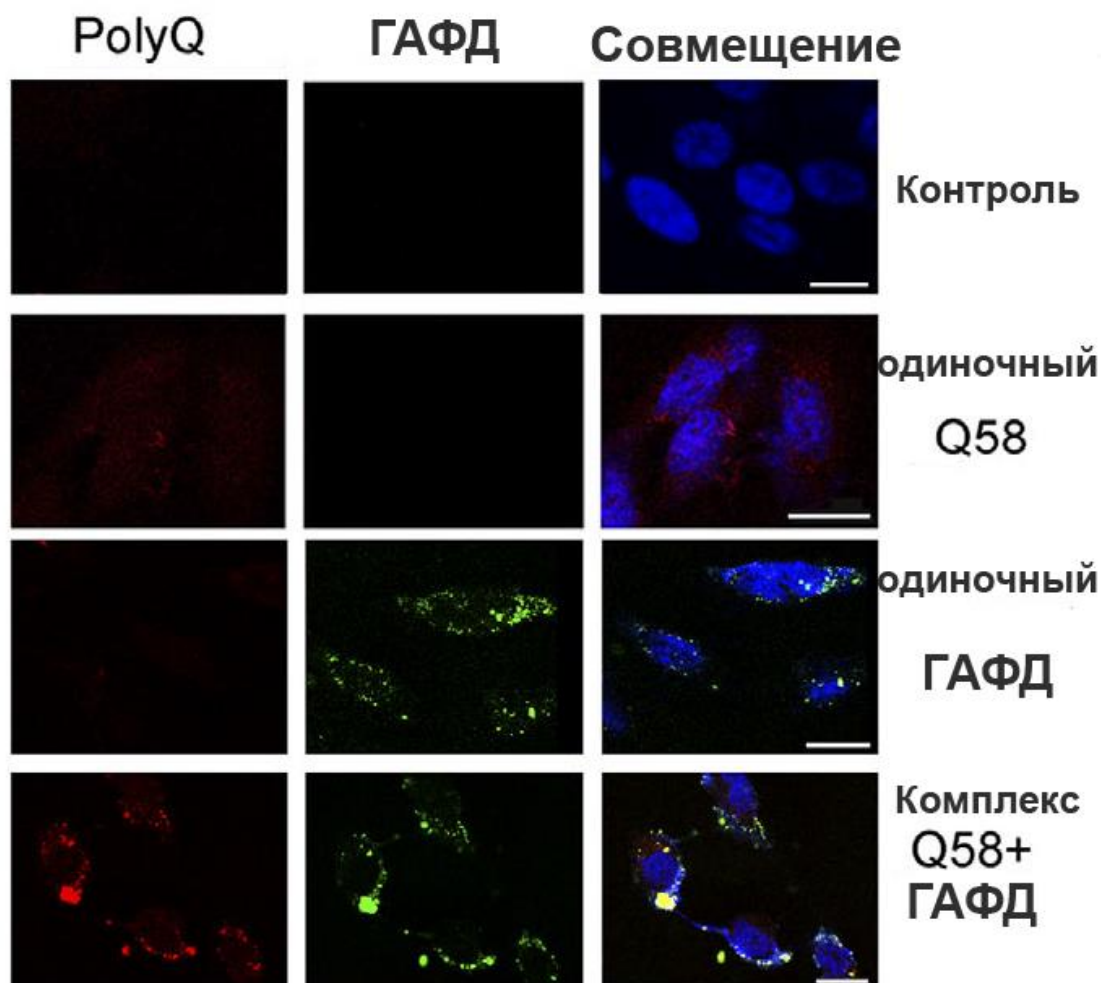


Рис.18. Проникновение ГАФД и polyQ внутрь клеток

Клетки SK-N-SH высевали на покровные стекла и инкубировали с ГАФД, меченым красителем Alexa 488 (зеленый) и Q58 по отдельности или в комплексе в течение 6 или 36 часов. Затем клетки промывали, фиксировали, пермеабелизировали и окрашивали антителами против polyQ (красный). Ядра окрашивали DAPI (синий).

Масштабная линейка: 1 мкм.

Для того чтобы определить, усиливает ли ГАФД прион-подобные свойства polyQ, вошедшего в интактные клетки (например, таким, как способность вызывать агрегацию внутриклеточного Htt с нормальной длиной глутаминовых повторов), мы трансфецировали клетки SK-N-SH плазмидой, несущей 1-й экзон гена HTT с 25 CAG триплетами, слитыми с геном зеленого флуоресцентного белка (EGFP; Q25-EGFP) и внесли в культуральную среду этих клеток чистые белки Q58 и ГАФД, в комплексе

или по отдельности. Введение одиночного белка Q58 приводило к тому, что в клетках, несущих Q25-EGFP, начали образовываться агрегаты, однако при введении Q58 в комплексе с ГАФД, количество и размер агрегатов были значительно больше и увеличивались при повышении концентрации ГАФД (рис. 19). Мы не наблюдали агрегации Q25-EGFP при инкубации клеток SK-N-SH с Q23 по отдельности или в комплексе с ГАФД.

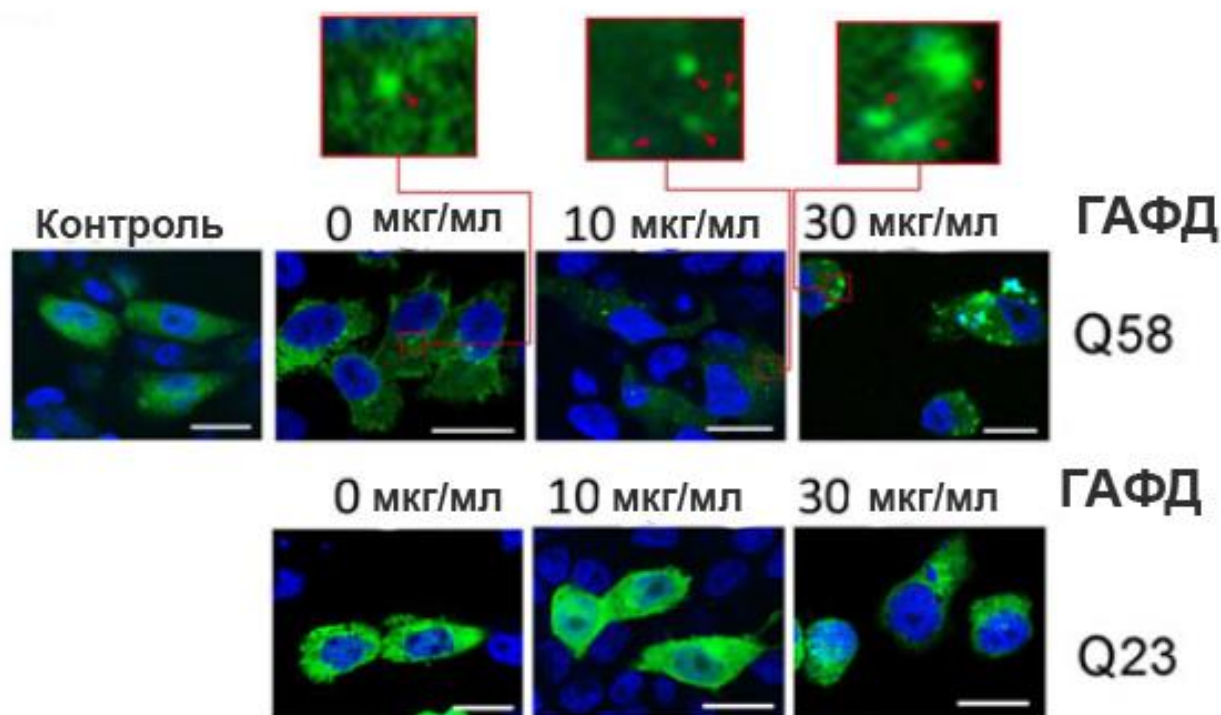


Рис.19. ГАФД увеличивает способность белков с длинным полиглютаминовым трактом изменять нормальные клеточные аналоги подобно прионным белкам.

Клетки SK-N-SH трансфицировали плазмидой, содержащей последовательность, кодирующую первый экзон htt с Q25. Через 24 часа после трансфекции мы добавляли Q23 или Q58 по отдельности или в комплексе с ГАФД в указанных концентрациях к клеткам и инкубировали следующие 48 часов. После этого клетки фиксировали и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. Ядра окрашивали DAPI.

Масштабная линейка: 5 мкм

Данные, полученные с помощью метода конфокальной микроскопии, были подтверждены в опытах с применением метода ультрафильтрации. Мы получили экстракты клеток SK-N-SH, трансфецированных плазмидой Q25-EGFP и инкубированных с Q58 по отдельности или в комплексе с ГАФД, как описано выше, и внесли их в манифолд. Полученные фильтры инкубировали

с антителами против polyQ. Количество ДСН-нерастворимых агрегатов polyQ-ГАФД увеличивалось дозозависимо, что доказывает роль ГАФД в увеличении прион-подобной активности polyQ (рис. 20).

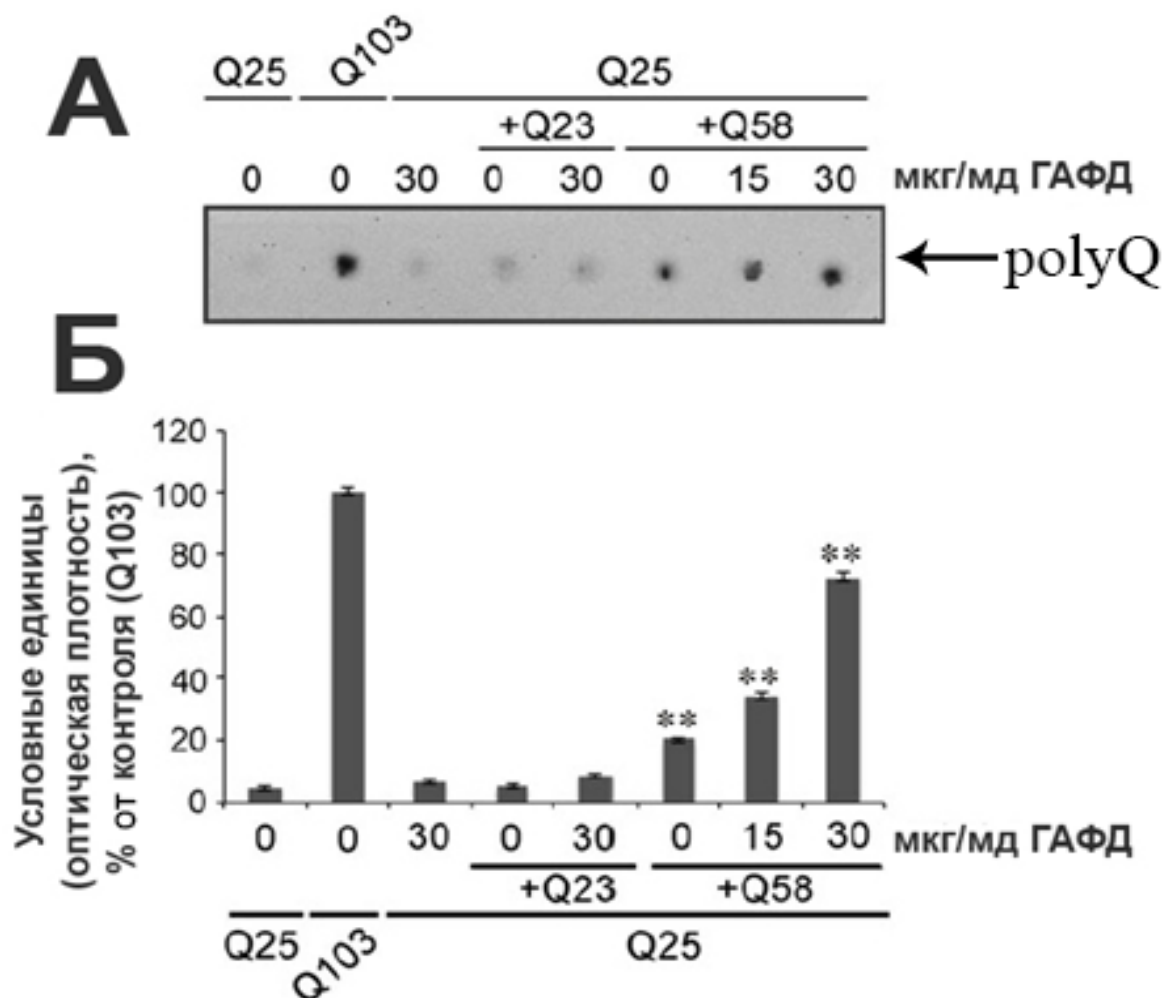


Рис.20. Ультрафильтрация лизатов клеток, полученных в результате трансфекции плазмидой Q25-EGFP и инкубированных с Q58 или Q23 по отдельности или в комплексе с ГАФД в течение 48 часов.

А. В качестве положительного контроля были использованы лизаты клеток SK-N-SH, трансфецированных плазмидой, содержащей Q103.

Б. Измерение уровня сигнала при помощи программы TotalLabQuant.

5.3. ГАФД транспортирует polyQ внутрь живых клеток с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза

Механизмы, регулирующие внутриклеточный транспорт агрегатов polyQ, до сих пор остаются неясными, и в то же время изучение миграции комплексов белков заслуживает внимания. Для того чтобы понять, каким

образом комплексы polyQ-ГАФД проникают в клетки, мы использовали метод ингибиторного анализа с применением специфичных ингибиторов внутриклеточного транспорта. Для предотвращения клатрин-зависимого эндоцитоза использовали динасор и хлорпромазин, для подавления кавеолин-зависимого эндоцитоза – филиппин, а для подавления макропиноцитоза – амилорид. Для нарушения внутриклеточного транспорта, зависящего от цитоскелета, использовали цитохалазин D и нокодазол, а для разрушения липидных рафтов и подавления кавеолин-зависимого эндоцитоза – метил-бета-циклодекстрин (M β CD).

Мы исследовали проникающую способность Q58, ГАФД и их комплексов при помощи метода клеточного ИФА с использованием клеток SK-N-SH. Мы вносили Q58 и ГАФД в культуральную среду, вместе и по отдельности в присутствии ингибиторов внутриклеточного транспорта, и спустя 6 часов после тщательной отмывки окрашивали антителами либо к polyQ, либо к ГАФД. Как было показано на рис.17, Q58 проникал в клетки SK-N-SH с низкой эффективностью. В опытах с применением клеточного ИФА сигнал в лунках с Q58 был низким, а изменения в присутствии ингибиторов были незначительными (данные не показаны).

ГАДФ, напротив, проникала в клетки SK-N-SH с высокой эффективностью, и ингибиторы внутриклеточного транспорта селективно подавляли его вхождение.

Поскольку амилориды M β CD не влияли на проникновение чистой ГАФД в клетки, а подавление вхождения фермента с помощью филиппина было статистически недостоверным, мы предположили, что пиноцитоз, липидные рафты и кавеолин-зависимый эндоцитоз не вовлечены в механизмы внутриклеточного транспорта ГАФД. Более эффективное подавление вхождения ГАФД в клетки произошло в присутствии ингибиторов клатрин-зависимого эндоцитоза, динасора и хлорпромазина, которые снизили внутриклеточный транспорт ГАФД на $68,3 \pm 5,8\%$ и $68,9 \pm 2,6\%$, соответственно (рис. 21). Цитохалазин D, который является

мощным ингибитором актин-зависимого эндоцитоза, снизил интернализацию ГАФД до $40,7 \pm 2,9\%$; в то время как ингибитор тубулин-зависимого эндоцитоза – на $62,36 \pm 4,2\%$. Обобщая результаты этого эксперимента, можно сделать вывод, что ГАФД преимущественно использует путь клатрин-зависимого эндоцитоза при проникновении в живые клетки.

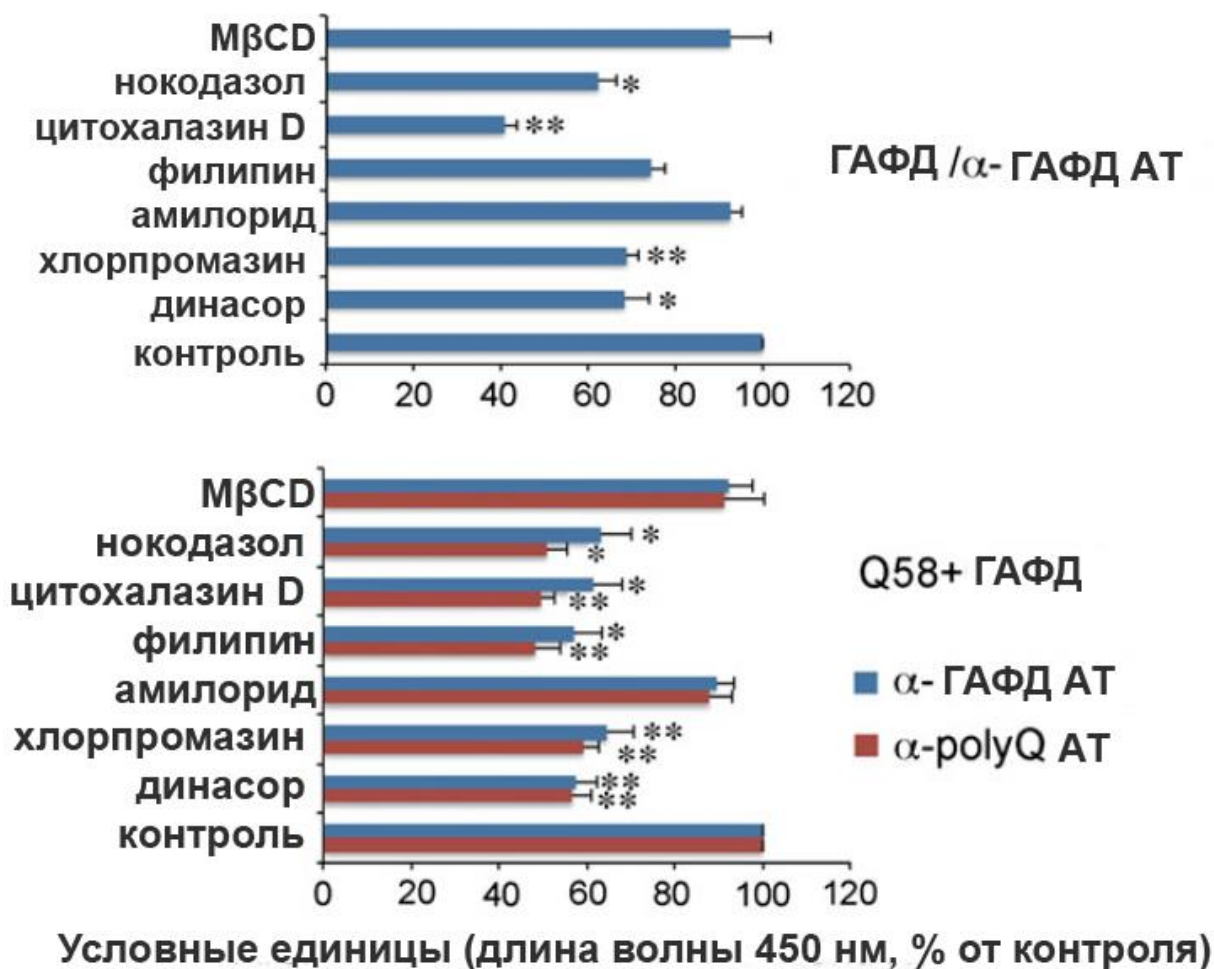


Рис.21. Проникновение ГАФД и polyQ-ГАФД комплексов в живые клетки с использованием эндоцитозного пути.

Клетки SK-N-SH инкубировали с ГАФД или Q58-ГАФД комплексами в присутствии ингибиторов внутриклеточного транспорта в течение 6 часов и анализировали при помощи метода клеточного ИФА. Представлены обобщённые данные трех независимых экспериментов.

Статистическая значимость: $p < 0,05$ (*) или $p < 0.01$ (**)

Механизм транспорта комплексов Q58 и ГАФД внутри клеток SK-N-SH напоминал механизм транспорта одиночной ГАФД. Амилорид и МβCD не подавляли проникновение комплекса Q58-ГАФД в клетки, что было

показано как с помощью антител к ГАФД, так и антител против polyQ, подтверждая тем самым, что макропиноцитоз и пиноцитоз не вовлечены в транспорт данных белков. В то же время динасор и хлорпромазин, ингибирующие клатрин-зависимый эндоцитоз, подавляли транспорт комплексов Q58-ГАФД внутрь клеток. Динасор уменьшал проникновение комплексов до $56,6 \pm 4,4\%$ (антитела против polyQ) и $57,3 \pm 5,2\%$ (антитела против ГАФД), а хлорпромазин – до $59,1 \pm 3,6\%$ (антитела против polyQ) и $64,5 \pm 6,1\%$ (антитела против ГАФД). Ингибиторы тубулин-зависимого и актин-зависимого эндоцитоза подавляли проникновение Q58-GAPDH комплексов до $50,9 \pm 4,6\%$ и $62,9 \pm 7,1\%$ (нокодазол) и до $49,5 \pm 3,2\%$ и $61,4 \pm 6,6\%$ (цитохалазин D), как показали антитела против polyQ или против ГАФД соответственно (рис. 14). Интересно, что в отличие от чистой ГАФД, вхождение комплекса подавлялось при использовании ингибитора филипина до $64,5 \pm 5,2\%$, что говорит о возможности вовлеченности в механизм внутриклеточного транспорта и кавеолин-зависимого эндоцитоза.

Обобщая эти данные, можно сказать, что преимущественно ГАФД ответственна за внутриклеточный транспорт polyQ, осуществляемый с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза, и за возможность прионизации нормального клеточного аналога НТТ.

5.4. В клеточной модели БХ внеклеточные агрегаты polyQ-ГАФД обладают большей цитотоксичностью, чем внутриклеточные агрегаты.

Как показывают результаты первой части этого исследования, агрегаты, содержащиеся в кондиционированной среде, токсичны для интактных клеток. В то же время уровень клеточной смерти возрастает по мере роста агрегатов внутриклеточного Q103 в клетках, несущих соответствующую генетическую конструкцию (рис. 8 и 10). Какие агрегаты, внутренние или находящиеся во внеклеточном пространстве, более токсичны для живых клеток? Чтобы ответить на этот вопрос, мы использовали клетки

РС-12HttQ103, в которых индуцировали экспрессию HttQ103. Клетки посеяли в лунки 96-луночного планшета и ввели ПонА. Через 8 ч во всех лунках, кроме лунок одной группы, заменили на свежую среду, чтобы удалить высвободившиеся агрегаты polyQ; в этой группе лунок продолжили культивирование в старой среде (в итоге в этой группе не меняли среду в течение 48 ч). Восемь часов спустя, среду снова заменяли во всех лунках, за исключением еще одной группы лунок (40 ч). Эту процедуру мы повторяли ещё четыре раза, и в итоге получили клетки, которым не меняли среду в течение 32, 24, 16 и 8 ч. Жизнеспособность клеток анализировали с помощью метода МТТ (рис. 22), а наличие агрегатов в среде определяли с использованием метода ультрафильтрации. Также с помощью метода ультрафильтрации был оценен уровень агрегации внутриклеточных белков (рис. 23).

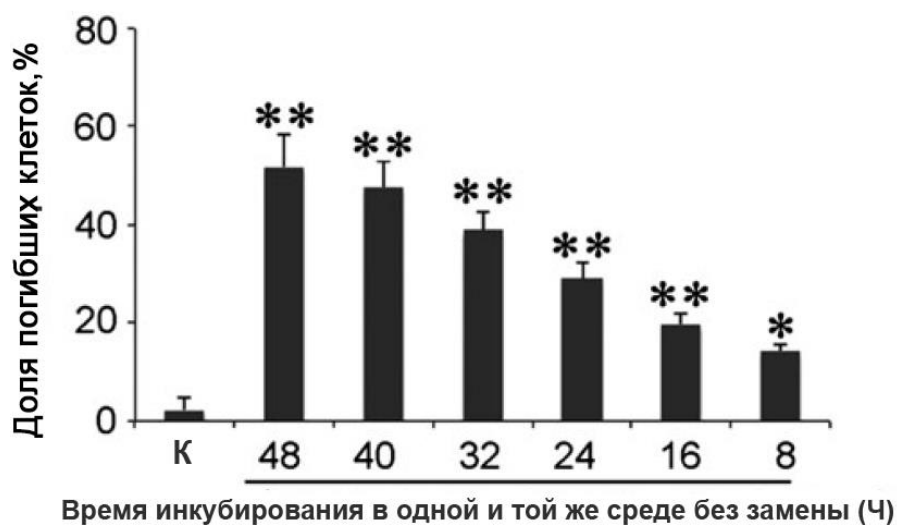


Рис.22. Внеклеточные агрегаты polyQ-ГАФД более токсичны, чем их внутриклеточные аналоги.

Клетки РС-12HttQ103 индуцировали экспрессию Q103 с помощью ПонА. Каждые восемь часов питательные среды, содержащие агрегаты, высвобожденные из клеток, заменяли на свежую среду следующим образом: группа 48 ч — среду не заменялись; 40 ч — среду меняли 1 раз через 8 ч после индукции ПонА; 32 ч — среду меняли 2 раз через 8 и 16 ч после введения ПонА; 24, 16 и 8 ч - три, четыре и пять замен соответственно. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью метода МТТ через 48 ч после индукции ПонА.

Как показали результаты, полученные с помощью метода ультрафильтрации, независимо от времени инкубации со средой, содержащей внеклеточные агрегаты, количество внутриклеточных агрегатов было одним и тем же, в то время как число внеклеточных агрегатов уменьшалось по мере сокращения времени инкубации клеток в несменяемой среде (рис. 23).

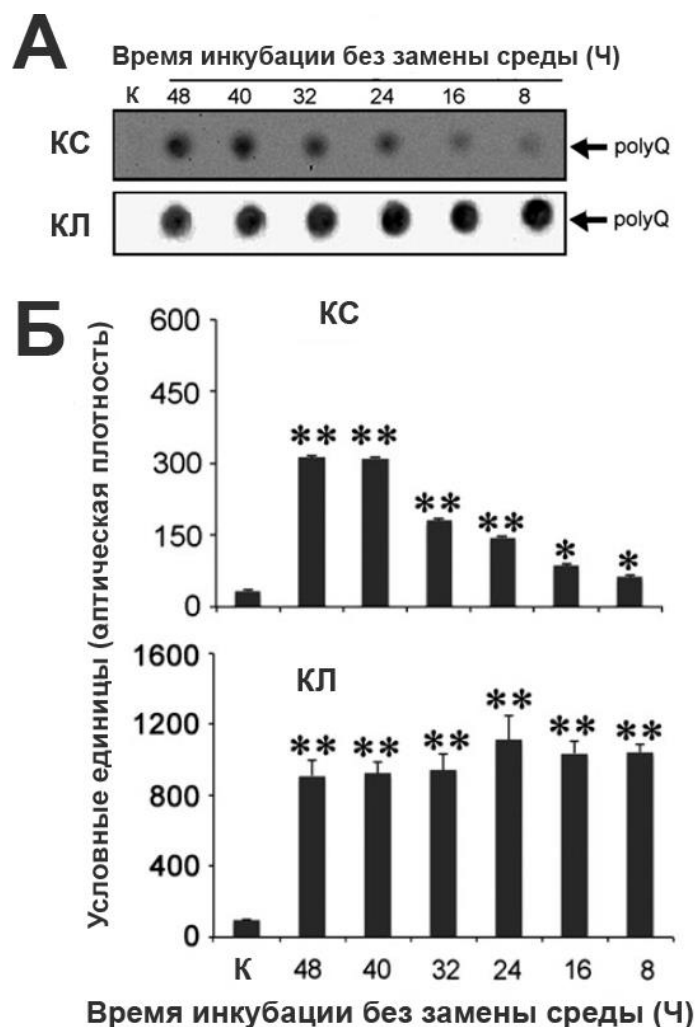


Рис.23. Измерение количества внеклеточных агрегатов polyQ при помощи метода ультрафильтрации.

А. Ультрафильтрация кондиционированной среды (КС) (1 мл), клетками PC-12HttQ103, которым меняли среду каждые 8 ч в течение 48 ч как описано в рис.16, и клеточных лизатов этих же клеток (КЛ).

Б. Измерение уровня сигнала при помощи программы TotalLabQuant.

Сопоставление данных, полученных с помощью метода ультрафильтрации и оценки жизнеспособности клеток, показало, что

количество погибших клеток коррелирует с количеством агрегатов polyQ в клеточной среде: чем меньше ДСН-нерастворимых включений, тем меньше мертвых клеток (рис.23). Смертность клеток, которым заменяли среду 5 раз каждые 8 ч (8 ч культивирования в неизменной среде), составила $14,3 \pm 5,8\%$. А смертность клеток, которым не заменяли среду в течение 48 ч, составила $62,1 \pm 7,8\%$. Эти данные привели нас к выводу, что именно внеклеточные агрегаты polyQ-ГАФД в значительной мере способствуют клеточной токсичности и еще более токсичны, чем внутриклеточные агрегаты.

6. ОБСУЖДЕНИЕ

Прион-подобное распространение мутантных белков, виновников наследственных нейродегенеративных заболеваний, стало очевидным после демонстрации способности tau-белка, мутантного α -синуклеина и полиглутаминовых белков передаваться между клетками (см. Kfoury et al, 2012; Luk et al, 2012; Ren et al., 2009). Основной вывод из этих работ заключается в том, что агрегаты мутантных белков могут высвобождаться из клеток или тканей, передаваться другим группам клеток и вызвать агрегацию внутриклеточных аналогов или случайных белков (как это было показано в случае передачи tau-белка) (Seindler, Seindler, 2013). В результате нейроны приобретают патогенный фенотип, типичный для БП (Seindler, 2013). Тем не менее, эти исследования не учитывают состав и распределение мигрирующих белковых комплексов и природу их цитотоксичности. Ранее в работах нашей лаборатории было показано, что трансглутаминаза, фермент, который стимулирует образование ковалентных связей между глутаминовыми остатками одного белка и лизинов другого, ускоряет образование комплексов мутантного НТТ и СОД1 (доноров глутаминовых остатков) с ГАФД (донором лизинов), и что эти комплексы токсичны в клеточных моделях БХ и БАС (Lazarev et al, 2013).

ГАФД является высоко консервативным белком, который был охарактеризован в 1950 как фермент гликолиза. Он катализирует окислительное фосфорилирование гликолитического субстрата D-глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-бис-фосфо-D-глицерат с сопутствующим переходом НАД⁺ в НАДН (Bruns and Gerald, 1976). Однако последние годы было показано, что ГАФД имеет гораздо большее значение в клеточной жизни, чем считалось ранее. Фермент ГАФД взаимодействует с множеством разнообразных клеточных белков. Интерактома ГАФД включает белки мембранного транспорта белков, G-белки, Ca²⁺-связывающие белки,

внеклеточные рецепторные белки, молекулярные шапероны и другие (Margulis et al., 2013).

В наших ранних исследованиях было показано, что ГАФД не только присутствует в агрегатах polyQ, но также усиливает агрегацию (Guzhova et al, 2011), а ГАФД-связывающие соединения предотвращают агрегацию polyQ в клеточной модели БХ и в трансгенных мухах, несущих ген атаксина с Q78 (Lazarev et al., 2015). Мы предположили, что подобные комплексы могут стать источником для дальнейшего межклеточного переноса mHTT и изучили влияние ГАФД на миграцию polyQ структур в клеточной модели БХ.

Более того, биндеры ГАФД, выявленные в нашей работе в процессе высокопроизводительного скрининга, спасали клетки нейробластомы в условиях окислительного стресса (Lazarev et al., 2016 а). Выбранные препараты, получившие название RX409 и RX426, уменьшали агрегацию ГАФД в клетках нейробластомы и понижали уровень клеточной смерти на 30%. У животных, у которых оксидативный стресс стимулировали введением малоновой кислоты в мозг, применение выявленных препаратов приводило к уменьшению зоны поражения, что было показано с помощью ядерно-магнитно-резонансной томографии, и значительно улучшались поведенческие показатели (Lazarev et al., 2016 б).

В экспериментах, описанных в настоящей работе, было показано, что появление агрегатов polyQ в клетках PC-12HttQ103, в которых индукцию синтеза mHTT вызывали с помощью ПонА, приводило к гибели клеток и появлению ГАФД в культуральной среде (рис 10-12).

Причина, по которой умирают клетки с растущими агрегатами polyQ, остаётся дискуссионной. Некоторые авторы считают, что цитотоксический эффект может складываться из воздействия на клетку олигомеров мутантных белков, накопления агрегатов или активных форм кислорода, дефектов в Ca^{2+} -регуляции и из-за других причин (Firdaus et al, 2006). Однако, по крайней мере, частично цитотоксический эффект может быть

связан с инактивацией ГАФД в результате окислительного стресса, происходящего в клетках, содержащих агрегаты polyQ (Volpicelli-Daley et al, 2011; Petkova et al, 2005).

Молекулы ГАФД в инактивированном состоянии способны высвобождаться из умирающих клеток, и мы измеряли внеклеточный уровень ГАФД, используя несколько подходов. Мы использовали разработанный в нашей лаборатории новый анализ на основе двухсайтового иммуноферментного анализа и показали, что через 48 ч после индукции экспрессии гена polyQ концентрация ГАФД увеличивается до 130 нг/мл (рис. 10). Этот концентрат мог состоять из растворимых форм ГАФД, в том числе из смеси моно-, ди- и тетрамеров, так как ДСН-нерастворимые фракции не были распознаны поликлональными антителами (данные не показаны). Результаты иммуноблотинга показали аналогичную кинетику уровня внеклеточной ГАФД: уровень фермента увеличивался с незначительной величины до величины, равной 150-300 нг/мл в соответствии с денситометрическим чтением. Используя метод ультрафильтрации для оценки количества нерастворимой ГАФД, мы показали, что (I) внеклеточные агрегаты состоят из ГАФД и mHTT и (II) кинетика их накопления идентична кинетике накопления растворимых форм ГАФД (рис. 11). Мы сравнили количество мертвых клеток и концентрации растворимых и нерастворимых форм ГАФД во времени. Динамики изменения данных параметров были идентичны, и мы предположили, что ГАФД и polyQ высвобождаются из мертвых клеток. Эта гипотеза была подтверждена анализом активности ЛДГ при использовании набора CytoTox-96. Таким образом, polyQ-ГАФД агрегаты накапливаются в клетках, что влечёт за собой гибель клеток и высвобождение патогенных белков во внеклеточный матрикс (рис. 11, 12).

Комплексы polyQ-ГАФД, помещенные в культуру интактных клеток, оказались цитотоксичными независимо от того, несли ли акцепторные клетки генетическую конструкцию с мутантным белком или нет (рис. 12). Более того, чем больше агрегатов находилось во внеклеточной среде, тем больше

клеток погибало (рис. 12). Удаление агрегатов из кондиционированной среды, полученной от клеток с растущими агрегатами, отменяло цитотоксичность (рис.13, 14), что привело нас к выводу о том, что именно внеклеточные агрегаты вызывают клеточную смерть. Наши данные согласуются с результатами других исследований, в которых утверждается, что большие внеклеточные агрегаты α -синуклеина (Yamaji et al, 2005) и β -амилоидного пептида (Munch et al, 2011) являются токсичными для нервных клеток.

Для того чтобы понять, какой из двух основных компонентов агрегатов polyQ-ГАФД обладает наибольшей цитотоксичностью, мы использовали очищенный фрагмент Q58 mHTT и инкубировали его в комплексе с ГАФД или по отдельности с клетками нейробластомы человека SK-N-SH. ГАФД значительно повышала токсичность комплекса с polyQ, а также была токсична сама по себе (рис. 15). В литературе известно только одно исследование влияния внеклеточной ГАФД, в котором показано, что введение фермента в культуральную среду к клеткам COS-7 и другим клеточным линиям коррелирует с морфологическими изменениями (Konno et al, 2012). Тем не менее, в цитируемой работе даже концентрация 100 мкг/мл внеклеточной ГАФД не вызвала клеточной гибели. Результаты наших исследований, напротив, показывают, что концентрация 20 мкг/мл ГАФД уже цитотоксична. Мы полагаем, что рекомбинантный белок, используемый в работе японской группы, обладает другими свойствами и, в частности, неспособен проникать внутрь клетки, таким образом, обезвреживается. Важно сделать вывод, что ГАФД увеличивает токсичность Q58 на 15-20% в зависимости от концентрации белка в комплексе. Токсичность одиночного пептида Q58 (20 мкг/мл) была умеренной и составляла 13%, а токсичность Q58 в комплексе с ГАФД (30 мкг/мл) увеличивалась до 33%. Отсутствие токсичности пептида K2Q44K2 при проникновении в клетки HEK-293, показанное в работе Ren с соавторами, может быть связано с использованием более низкой концентрации, 5,5 мкг/мл (Ren et al, 2009). Фрагмент Q23,

представляющий собой нормальный, не патогенный аналог мутантного НТТ, не демонстрирует цитотоксической активности, и его токсичность в комплекс с ГАФД практически равна токсичности самой ГАФД (рис. 15).

Черета событий, происходящая во время прион-подобного патогенного распространения белков, начинается с экспорта агрегатов белков или склонных к агрегации белков из патогенных клеток вовнеклеточный матрикс и заканчивается захватом этих белков акцепторными клетками. Для того чтобы раскрыть роль ГАФД на последнем этапе, мы исследовали внутриклеточный транспорт компонентов комплекса polyQ-ГАФД при помощи методов клеточного ИФА, проточной цитометрии и конфокальной микроскопии. Мы обнаружили, что эффективность проникновения Q58 внутрь клеток SK-N-SH была довольно низкой. Наши данные противоречат работе Ren и соавторов, в которой было показано, что 90% клеток HEK-293 демонстрировали интернализацию синтетического пептида 2K-Q44-K2, (Ren et al, 2009). Возможно, клетки HEK-293 являются лучшей мишенью для пептида 2K-Q44-K2, кроме того, концевые лизины, добавленные в используемую авторами конструкцию, могли улучшить пенетративные свойства пептида за счет увеличения его катионности.

В отличие от polyQ, ГАФД легко проникала в клетки SK-N-SH, и его проникновение занимало от получаса (проточная цитометрия) до часа (клеточный ИФА) (рис. 16 и 17). Молекулы ГАФД, как было показано, ускоряют интернализацию Q58 и увеличивают эффективность его проникновения в три раза. Этот процесс был исследован с помощью трех различных методов, и полученные данные демонстрируют ключевую роль ГАФД во внутриклеточном транспорте mНТТ.

Также было важно оценить прион-подобную активность комплексов polyQ-ГАФД. Для этого мы инкубировали клетки SK-N-SH, экспрессирующие пептид нормальной длины Q25, слитый с EGFP, с чистыми белками и их комплексами. Мы оценивали степень агрегации в акцепторной клетке при помощи метода ультрафильтрации. Было показано, что

одинокый Q58 инициирует агрегацию эндогенных пептидов Q25 с низкой эффективностью, в то время как комплексы Q58-ГАФД в конечном счёте приводят к накоплению в клетках в 5-10 раз больше ДСН-нерастворимых образований. Эти результаты мы подтвердили при помощи микроскопического анализа: увеличивалась интенсивность окрашивания антителами против polyQ в обеих концентрациях ГАФД 15 и 30 мкг/мл. Прион-подобная активность является отличительным свойством таких патогенных полипептидов, как α -синуклеин, tau-белок, СОД1 и полиглутаминовые белки, и подробно описана в экспериментах *in vivo* и *in vitro* (DeCalignon et al, 2012; Luk et al, 2009; Grad et al, 2014). В нашей работе мы представили доказательства цитотоксической и прион-подобной активности таких мигрирующих агрегированных комплексов polyQ-ГАФД.

Существенным вопросом является выяснение механизмов проникновения polyQ и ГАФД в акцепторную клетку. В настоящее время существует лишь несколько исследований внутриклеточного транспорта больших белков агрегатов. Munch и соавторы показали, что агрегаты, состоящий из мутантной СОД1, проникают внутрь клетки с помощью микропиноцитоза и быстро выходят из макропиноцитозного компартмента для того, чтобы достичь цитоплазму и инициировать агрегацию своих клеточных гомологов (Munch et al, 2011). Мутантный α -синуклеин проникает в нейроны и олигодендроглиальные клетки посредством эндоцитоза, и транспорт сильно уменьшался при генетическом или фармакологическом ингибировании динамин ГТФазы (Konno et al, 2012). Высокая эффективность проникновения пептида K2Q44K2 в клетки НЕК-293, как мы предположили ранее, обусловлена его зарядом и наличием специфических акцепторных сайтов на поверхности клеток (Ren et al, 2009).

Наш анализ механизмов проникновения комплексов polyQ-ГАФД внутрь клеток с использованием ингибиторов различных транспортных путей показал, что ГАФД использует путь преимущественно клатрин-опосредованного эндоцитоза, в который вовлечены белки цитоскелета. При

анализе проникновения комплексов Q58-ГАФД в клетки с использованием антител к обоим белкам мы обнаружили подобную модель транспортного механизма (рис. 21). Основываясь на полученных результатах, мы можем заключить, что ГАФД играет важную роль во внутриклеточном транспорте Q58 и, возможно, других патогенных комплексов.

Как сообщалось выше, в литературе существует дискуссия о том, что является более токсичным для клеток, несущих мутантные белки. Многие авторы придерживаются мнения, что наиболее токсичными являются олигомеры мутантных белков, а формирование агрегатов представляет собой защитную реакцию клетки (He et al, 2012). Т.е., согласно этой точке зрения, формирующийся агрегат собирает и инактивирует токсичные олигомеры, в результате чего олигомеры утрачивают свою токсичность (Verma et al, 2012). Другие авторы утверждают, что одной из токсических функций мутантного НТТ является дестабилизация кальциевой сигнализации. Связывание мутантного НТТ с С-концом фосфатидилиназидольного рецептора IP3R1 приводит к опустошению внутриклеточных кальциевых депо, что нарушает физиологию клетки и, возможно, может привести ее к гибели (Wu et al., 2013). В начале нашей работы мы показали, что гибель клеток находится в корреляции с ростом и количеством внутриклеточных агрегатов (рис 8-10), в последующих экспериментах мы выяснили, что внеклеточные агрегаты также токсичны. Чтобы выяснить какие патогенные структуры (внутриклеточные или внеклеточные) в большей степени представляют угрозу для клетки, мы ввели в обиход новый метод, с помощью которого попытались ответить на этот вопрос. В ходе этого опыта клетки РС-12HttQ103 одновременно стимулировали к экспрессии HttQ103, но держали в собственной кондиционированной среде разное время, в течение которого в среде накапливалось разное количество агрегатов (рис. 23). Клетки РС-12HttQ103, которые инкубировались в собственной кондиционной среде 8 ч, в течение которых количество вышедших в среду агрегатов было минимальным, демонстрировали невысокий уровень смертности, 14,3% (рис.

22). Видимо, эту цифру мы можем принять за уровень цитотоксичности, вызванной внутриклеточными агрегатами. Инкубация клеток в несменяемой среде в течение 48 ч после индукции экспрессии HttQ103 привела к гибели 62,1% клеточной популяции. Полученные данные позволяют нам говорить о том, что внеклеточные агрегаты более токсичны, чем внутриклеточные. В свете этого становится не важным, что вызвало гибель первого нейрона. Важно, что в результате его гибели во внеклеточном пространстве появились инактивированная ГАФД и мутантный белок, которые способны формировать крупные агрегаты (Lazarev et al., 2015). Эти агрегаты вызывают гибель соседних клеток, прионизацию нормального клеточного аналога, и те в свою очередь становятся источником цитотоксических агрегатов polyQ-ГАФД для новых клеток. Видимо, явление горизонтального переноса является причиной того, что при болезни Хантингтона патология с течением времени переносится из стриатума, где берёт своё начало, в более отдаленные структуры головного мозга, включая кору, что приводит к гибели новых и старых нейронов, прогрессирующей нейродегенерации и, в конечном счете, к смерти.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе нам удалось показать, что гликолитический фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД), который усиливает образование агрегатов polyQ и повышает их клеточную токсичность (Guzhova et al, 2011; Lazarev et al., 2013), может высвобождаться из умирающих клеток и, формируя агрегаты с мутантным polyQ, становится токсичным для интактных клеток (рис. 24).

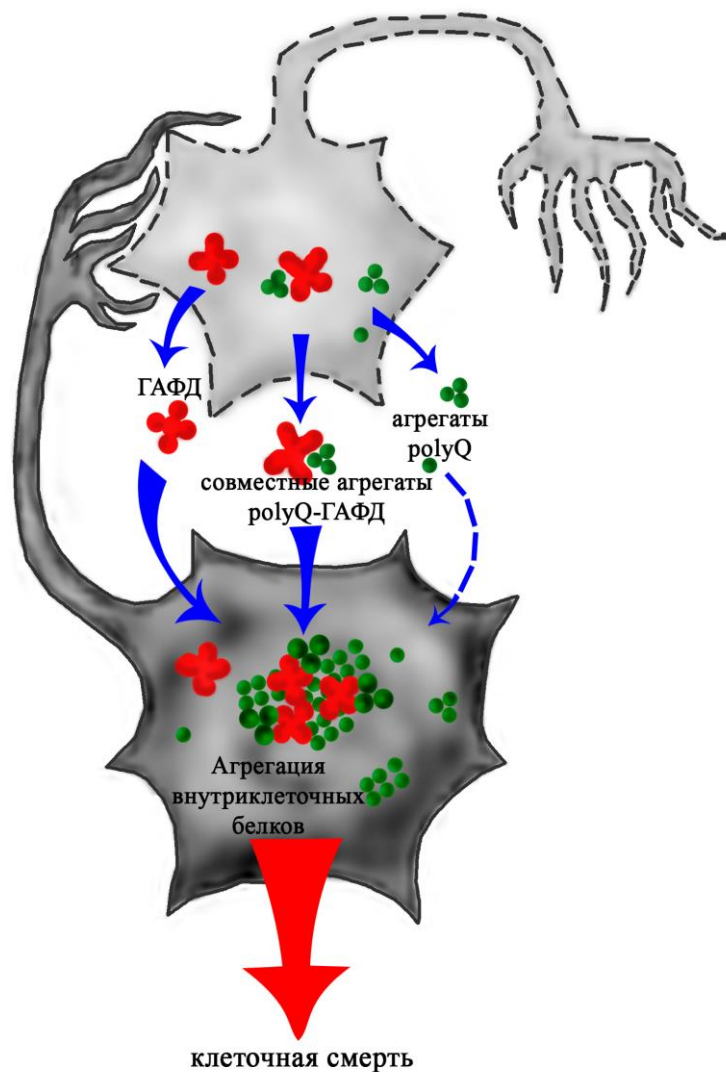


Рис.24. Роль ГАФД в межклеточном переносе патогенных белковых комплексов в клеточной модели болезни Хантингтона

Агрегаты polyQ в комплексе или по отдельности с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (ГАФД) высвобождаются из погибших клеток. ГАФД усиливает транспорт агрегатов polyQ внутрь здоровых клеток и прионизацию нормальных клеточных белков, что, в конце концов, приводит к гибели клеток.

Более того, ГАФД способна повышать проникающую способность polyQ в клетки и увеличивает способность данного пептида преобразовать нормальные клеточные аналоги в патогенные формы. Наконец, мы продемонстрировали, что внеклеточные комплексы polyQ-ГАФД более токсичны для клеток, чем их внутриклеточные аналоги (Mikhaylova et al, 2016). В свете этого ГАФД представляется удачной мишенью для терапии нейродегенеративных заболеваний, а малые молекулы — биндеры ГАФД — потенциальными лекарственными препаратами (Lazarev et al, 2015, 2016 а,б).

8. ВЫВОДЫ

1. ГАФД выходит из клеток с растущими агрегатами мутантного хантингтина в комплексе с последним; экспорт обоих белков и их комплексов осуществляется из мёртвых клеток.
2. Агрегаты polyQ-ГАФД более токсичны для нормальных клеток, чем каждый из белков по отдельности.
3. ГАФД способен проникать внутрь клеток и обеспечивать вхождение polyQ в нормальные клетки. Внутриклеточный транспорт комплекса PolyQ-ГАФД происходит посредством клатрин-зависимого эндоцитоза.
4. ГАФД усиливает способность polyQ индуцировать агрегацию внутриклеточных нативных белков.
5. Внеклеточные агрегаты комплексов polyQ-ГАФД более токсичны, чем их внутриклеточные аналоги.

9. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Гаврилова С.И.* 2002. Практическое руководство по диагностике и лечению болезни Альцгеймера. М. 42 с.
2. *Дамулин И.В.* 2004. Некоторые аспекты дифференциальной диагностики и терапии деменций. М. 85с.
3. *Иллариошкин С.Н., Ключников С.А., Брылев Л.В. Федин П.А., Маркова Е.Д.* Превентивная нейропротекция при нейродегенеративных заболеваниях: использование антагонистов глутаматных рецепторов. Неврол. Журнал, 2006; 5: 47–53.
4. *Лазарев В.Ф., Сверчинский Д.В., Ипполитова М.В., Казначеева А.В., Гужова И.В., Маргулис Б.А.* Условия агрегации мутантных белков в клеточных моделях болезни Хантингтона и амиотрофического бокового склероза. Acta Naturae, 2013; 2(17): С. 34–43.
5. *Пономарёв В.В.* Нейродегенеративные заболевания: настоящее и будущее. Минск: Медицинские новости, 2007; 5: 2–28.
6. *Яхно Н.Н., Преображенская И.С., Захаров В.В.* Распространённость когнитивных нарушений при неврологических заболеваниях (анализ работы специализированного амбулаторного приёма). Неврол. журнал, 2003; 6: 4–11.
7. *Aguzzi A.* Unraveling prion strains with cell biology and organic chemistry. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008; 105(1): 11–12.
8. *Amantea G., Cammarano M., Zefferino L., Martin A., Romito G., Piccirillo M. and Gentile V.* Molecular mechanisms responsible for the involvement of tissue transglutaminase in human diseases: Celiac disease. Front. Biosci., 2006; 11: 249–255.
9. *Andrei C., Dazzi C., Lotti L., Torrisi M.R., Chimini G. and Rubartelli A.* The secretory route of the leaderless protein interleukin 1 beta involves

- exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol. Biol. Cell*, 1999; 10: 1463–1475.
10. *Apostol B.L., Illes K., Pallos J., Bodai L., Wu J., Strand A., Schweitzer E.S., Olson J.M., Kazantsev A., Marsh J.L., Thompson L.M.* Mutant huntingtin alters MAPK signaling pathways in PC12 and striatal cells: ERK1/2 protects against mutant huntingtin-associated toxicity. *Hum Mol Genet.*, 2006; 5: 273–285.
 11. *Arrasate M., Pérez M., Armas-Portela R., and Ávila J.* Polymerization of tau peptides into fibrillar structures. The effect of FTDP-17 mutations. *FEBS Letters*, 1999; 446(1): 199–202.
 12. *Assfalg, M., Banci, L., Bertini, I., Turano, P. and Vasos P.R.* Superoxide dismutase folding/unfolding pathway: role of the metal ions in modulating structural and dynamical features. *J Mol. Biol.*, 2003; 330: 145–158.
 13. *Baker S. C., Rogers R. D., Owen A. M., Frith C. D., Dolan R. J., Frackowiak R. S. J., and Robbins T. W.* Neural systems engaged by planning: A PET study of the Tower of London task. *Neuropsychologia*, 1996; 34: 515.
 14. *Berger Z., Roder H., Hanna A., Carlson A., Rangachari V., Yue M., Wszolek Z., Ashe K., Knight J., Dickson D., Andorfer C., Rosenberry T.L., Lewis J., Hutton M. and Janus C.* Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J. Neurosci.*, 2007; 27: 3650–3662.
 15. *Biesecker G., Harris J.I., Thierry J.C., Walker J.E., Wonacott A.J.* Sequence and Structure of Glyceraldehyde 3-Phosphate from *Bacillus stearothermophilus*. *Nature*, 1977; 266: 328–333.
 16. *Bogoyevitch M.A., Boehm I., Oakley A., Ketterman A.J., Barr R.K.* Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. *Biochim. Biophys*, 2004; 1697 (1–2): 89–101.
 17. *Bradford J.W., Li S. and Li X.J.* Polyglutamine toxicity in non-neuronal cells. *Cell Res.*, 2010; 20 (4): 400–407.

18. *Brundin P., Melki R., Kopito R.* Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010; 11: 301–307.
19. *Bruns G.A. and Gerald P.S.* Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in man–rodent somatic cell hybrids. *Science*, 1976; 192: 54–6.
20. *Brusse E., Maat-Kievit J.A. and van Swieten J.C.* Diagnosis and anagement of early- and late-onset cerebellar ataxia. *Clin. Genet.* , 2007; 71 (1): 12–24.
21. *Butterfield D.A., Hardas S.S., Lange M.L.* Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease: many pathways to neurodegeneration. *J. Alzheimers Dis.*, 2010; 20(2): 369–393.
22. *Camnasio S., Delli Carri A., Lombardo A., Grad I., Mariotti C., Castucci A., Rozell B., Lo Riso P., Cstiglioni V., Zuccato C., Rochon C., Takashima Y., Diaferia G., Biunno I., Gellera C., Jaconi M., Smith A., Hovatta O., Naldini L., Di Donato S., Feki A. and Cattaneo E.* The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. *Neurobiol. Dis.*, 2012; 46 (1): 41–51.
23. *Castiglioni V., Onorati M., Rochon C. and Cattaneo E.* Induced pluripotent stem cell lines from Huntington's disease mice undergo neuronal differetiation while showing alterations in the lysosomal pathway. *Neurobiol. Dis.*, 2012; 46 (1): 30–40.
24. *Chanez-Cardenas I M.E. and Vazquez-Contreras E.* The Aggregation of Huntingtin and α -Synuclein. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Biophysics*, 2012; Epub. Jul. 26.
25. *Cisbani G. and Cicchetti F.* An in vitro perspective on the molecular mechanisms underlying mutant huntingtin protein toxicity. *Cell Death Dis.*, 2012; 3: e382.

26. *Clavaguera F., Akatsu H., Fraser G., Crowther R.A., Frank S., Hench J., Probst A., Winkler D.T., Reichwald J., Staufenbiel M., Ghetti B., Goedert M., Tolnay M.* Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110(23): 9535–9540.
27. *Clavaguera F., Bolmont T., Crowther R.A., Abramowski D., Frank S., Probst A., Fraser G., Stalder A.K., Beibel M., Staufenbiel M.* Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11: 909–913.
28. *Cobb N.J., Sonnichsen F.D., McHaourab H. and Surewicz W.K.* Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2007; 104: 18946–18951.
29. *Cohen S.I., Linse S., Luheshi L.M., Hellstrand E., White D.A., Rajah L., Otzen D.E., Vendruscolo M., Dobson C.M., Knowles T.P.* Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2013; 110: 9758–9763.
30. *Colell A., Green D.R. and Ricci J.E.* Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. *Cell Death Differ.*, 2009; 16: 1573–1581.
31. *Cowin R.M., Roscic A., Bui N., Graham D., Paganetti P., Jankowsky J.L., Weiss A. and Paylor R.* Neuronal aggregates are associated with phenotypic onset in the R6/2 Huntington's disease transgenic mouse. *Behav. Brain Res.*, 2012; 229 (2): 308–319.
32. *DeCalignon A., Polydoro M., Suarez-Calvet M., William C., Adamowicz D. H., Kopeikina K. J., Pitstick R., Sahara N., Ashe K. H., Carlson G. A.* Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron*, 2012; 73: 685–697.
33. *Desplats P., Lee H.J., Bae E.J., Patrick C., Rockenstein E., Crews L., Spencer B., Masliah E., Lee S.J.* Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009; 106:13010–13015.
34. *Diaz-Hernandez M., Gomez-Ramos A., Rubio A., Gomez-Villafrutes, Naranjo J.R., Miras-Portugal M.T. and Avila J.* Tissue non-specific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 32539–32548.
 35. *DiFiglia M., Sapp E., Chase K. O., Davies S. W., Bates G. P., Vonsattel J. P. and Aronin N.* 1997. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 277: 1990–1993.
 36. *Eisele Y.S., Obermüller U., Heilbronner G., Baumann F., Kaeser S.A., Wolburg H., Walker L.C., Staufenbiel M., Heikenwalder M., Jucker M.* Peripherally applied Abeta-containing inoculates induce cerebral beta-amyloidosis. *Science*, 2010; 12330(6006): 980–982.
 37. *Fändrich M.* Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity. *J Mol. Biol.*, 2012; 42: 427–440.
 38. *Fevrier B., Vilette D., Archer F., Loew D., Faigle W., Vidal M., Laude H. and Raposo G.* Cells release prions in association with exosomes *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101(26): 9683–9688.
 39. *Figiel M., Szlachcic W.J., Switonski P.M., Gabka A. and Krzyzosiak W.J.* Mouse models of polyglutamine diseases: review and data table. *Mol. Neurobio.*, 2012.; 46 (2): 393–429.
 40. *Firdaus W.J., Wyttenbach A., Giuliano P., Kretz-Remy C., Currie R.W., Arrigo A.P.* Huntingtin inclusion bodies are iron-dependent centers of oxidative events. *FEBS J.*, 2006; 273:5428–5441.
 41. *Freundt E.C., Maynard N., Clancy E.K., Roy S., Bousset L., Sourigues Y., Covert M., Melki R., Kirkegaard K., Brahic M.* Neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein fibrils through axonal transport. *Ann Neurol*, 2012; 72:517–524.
 42. *Frost B., Jacks R. L. and Diamond M. I.* Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 12845–12852.

43. *Gentile V., Sepe C., Calvani M., Melone M.A., Cotrufo R., Cooper A.J., Blass J.P. and Peluso G.* Tissue transglutaminase-catalyzed formation of high molecular-weight aggregates in vitro is favored with long polyglutamine domains: a possible mechanism contributing to CAG-triplet diseases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998; 352 (2): 314–321.
44. *Goedert M., Klug A., Crowther R.A.* Tau protein, the paired helical filament and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.*, 2006; 9: 195–207.
45. *Gousset K., Schiff E., Langevin C., Marijanovic Z., Caputo A., Browman D.T., Chenouard N., de Chaumont F., Martino A., Enninga J., Olivo-Marin J.C., Männel D., Zurzolo C.* Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread. *Nat. Cell Biol.*, 2009; 11(3):328–36.
46. *Grad L.I., Yerbury J.J., Turner B.J., Guest W. C., Pokrishevsky E.* Intercellular propagated misfolding of wild-type Cu/Zn superoxide dismutase occurs via exosome-dependent and -independent mechanisms. *Current Issue*, 2014; 111 (9): 3620–3625.
47. *Guijarro J.I., Sunde M., Jones J.A., Campbell I.D. and Dobson C.M.* Ultrastructural organization of amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998; 95: 4224–4228.
48. *Guo J.L. and Lee V.M.* Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat. Med.*, 2014; 20 (2): 130–138.
49. *Guzhova I.V., Lazarev V.F., Kaznacheeva A.V., Ippolitova M.V., Muronetz V.I., Kinev A.V., Margulis B.A.* Novel mechanism of Hsp70 chaperone-mediated prevention of polyglutamine aggregates in a cellular model of huntington disease. *Hum. Mol. Genet.*, 2011; 20: 3953–3963.
50. *Haass C. and Selkoe D.J.* Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007; 8: 101–112.
51. *Hansen C., Angot E., Bergstrom A.L., Steiner J.A., Pieri L., Paul G., Outeiro T.F., Melki R., Kallunki P., Fog K.* Alpha-Synuclein propagates from

- mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation incultured human cells. *J. Clin. Invest.*, 2011; 121: 715–725.
52. *Harjes P. and Wanker E.E.* The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem. Sci.*, 2003; 28 (8): 425–433.
 53. *Hartmann T., Bieger S.C., Brühl B., Tienari P.J., Ida N., Allsop D., Roberts G.W., Masters C.L., Dotti C.G., Unsicker K., Beyreuther K.* Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta 40/42 amyloid peptides. *Nat. Med.*, 1997; 3 (9): 1016–20.
 54. *He Y., Zheng M.M., Ma Y., Han X.J., Ma X.Q., Qu C.Q., Du Y.F.* Soluble oligomers and fibrillar species of amyloid β -peptide differentially affect cognitive functions and hippocampal inflammatory response. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 2012; 429: 125–130.
 55. *Hofmann J.P., Denner P., Nussbaum-Krammer C., Kuhn P.H., Suhre M.H., Scheibel T., Lichtenthaler S.F., Schatzl H.M., Bano D., Vorberg I.M.* Cell-to-cell propagation of infectious cytosolic protein aggregates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013; 110(15): 5951–5956.
 56. *Holmes B.B., Diamond M.I.* 2012. Cellular mechanisms of protein aggregate propagation. *Curr Opin Neurol.*, 25:721–726.
 57. *Jenkins J.L., Tanner J.J.* High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2006; 62: 290–301.
 58. *Johri A. and Beal M.F.* Huntington for new proteases: MMPs as the new target? *Neuron*, 2010; 67 (2): 171–173.
 59. *Kadmiri N., Slassi I., Moutawakil B., Nadifi S., Tadevosyan A., Hachem A., Soukri A.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and Alzheimer's disease. *Pathol. Biol.*, 2014; 62:333–336.
 60. *Kane M.D., Lipinski M.J., Callahan F., Bian R.A., Durham R.D., Schwarz A.E., Roher W.J. and Walker L.C.* Evidence for seeding of beta-amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta-

- amyloid precursor protein-transgenic mice. *J. Neurosci.*, 2000; 20:3606–3611.
61. Kanu N., Imokawa Y., Drechsel D.N., Williamson R.A., Birkett C.R., Bostock C.J., Brookes J.P. Transfer of scrapie prion infectivity by cell contact in culture. *Curr. Biol.*, 2002; 12(7):523–530.
 62. Karpuj M.V., Becher M.W., Springer J.E., Chabas D., Youssef S., Pedotti R., Mitchell D. and Steinman L. Prolonged survival and decreased abnormal movements in transgenic model of Huntington disease, with administration of the transglutaminase inhibitor cystamine. *Nat. Med.*, 2002; 8 (2): 143–149.
 63. Kfoury N., Holmes B.B., Jiang H., Holtzman D.M., Diamond M.I. Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *J Biol. Chem.*, 2012; 287:19440–19451.
 64. Klockgether T. 2003. Ataxias. In: Goetz C.H. (Ed.). *Textbook of Clinical Neurology*. WB Saunders Publishing. Philadelphia., pp. 741–757.
 65. Kokalj J., Stoka V., Kenig M., Guncar G., Turk D. and Zerovnik E. A Central Role for Protein Aggregation in Neurodegenerative Disease. Mechanistic and Structural Studies of Human Stefins. *Acta Chim.*, 2005; 52: 27–33.
 66. Konno M., Hasegawa T., Baba T., Miura E., Sugeno N., Kikuchi A., Fiesel F.C., Sasaki T., Aoki M., Itoyama Y., Takeda A. Suppression of dynamin GTPase decreases α -synuclein uptake by neuronal and oligodendroglial cells: a potent therapeutic target for synucleinopathy. *Molecular Neurodegeneration*, 2012; Epub Aug. 14.
 67. Kordower J.H., Chu Y., Hauser R.A., Freeman T.B., Olanow C.W. Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.*, 2008; 14: 504–506.
 68. Koshy B., Matilla T., Burright E.N., Merry D.E., Fishbeck K.H., Orr H.T., Zoghbi H.Y. Spinocerebral ataxia type-1 and spinobulbular muscular atrophy

- gene products interact with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Hum. Mol. Genet.*, 1996; 5: 1311–1318.
69. *Kraulis P.J.* MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, 1991; 24: 946–950.
 70. *Lakkaraju A. and Rodriguez-Boulan E.* Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends Cell Biol.*, 2008; 18: 199–209.
 71. *Lasagna-Reeves C.A., Castillo-Carranza D.L., Sengupta U., Guerrero-Munoz M.J., Kiritoshi T., Neugebauer V., Jackson G.R. and Kayed R.* Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Sci. Rep.*, 2012; 2: 700.
 72. *Lazarev V.F., Benken K.A., Semenyuk P.I., Sarantseva S.V., Bolshakova O.I., Mikhaylova E.R., Muronetz V.I., Guzhova I.V., Margulis B.A.* GAPDH binders as potential drugs for the therapy of polyglutamine diseases: design of a new screening assay. *FEBS Lett.*, 2015; 589: 581–587.
 73. *Lazarev V.F., Nikotina A.D., Semenyuk P.I., Evstafyeva D.B., Mikhaylova E.R., Muronetz V.I., Shevtsov M.A., Tolkacheva A.V., Dobrodumov A.V., Shavarda A.L., Guzhova I.V., Margulis B.A.* Small molecules preventing GAPDH aggregation are therapeutically applicable in cell and rat models of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016; 92: 29–38.
 74. *Lazarev V.F., Nikotina A.D., Mikhaylova E.R., Nudler E., Polonik S.G., Guzhova I.V., Margulis B.A.* Hsp70 chaperone rescues C6 rat glioblastoma cells from oxidative stress by sequestration of aggregating GAPDH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2016a: 470(3):766–771.
 75. *Lazarev V.F., Sverchinsky D.V., Ippolitova M.V., Stepanova A.V., Guzhova I.V., Margulis B.A.* Factors Affecting Aggregate Formation in Cell Models of Huntington's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Acta Naturae*, 2013; 5: 81–89.
 76. *Leal S.S., Cardoso I., Valentine J.S., Gomes C.M.* Calcium ions promote superoxide dismutase 1 (SOD1) aggregation into non fibrillar amyloid: a

- link to toxic effects of calcium overload in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)? *J. Biol. Chem.*, 2013; Epub. July 16.
77. *Lee H.J., Patel S., Lee S.J.* Intravesicular localization and exocytosis of alphasynuclein and its aggregates. *J. Neurosci.*, 2005; 25: 6016–6024.
 78. *Li J.Y. and Conforti L.* Axonopathy in Huntington's disease. *Exp. Neurol.*, 2010; S0014-4886(12): 319–316.
 79. *Liao Y.C., Lebo R.V., Clawson G.A., Smuckler E.A.* Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science*, 1986; 233 (4761): 364–367.
 80. *Lin X., Antalffy B., Kang D., Orr H.T. and Zoghbi H.Y.* Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nat. Neurosci.*, 2000; 3 (2): 157–163.
 81. *Lindberg M. J., Normark J., Holmgren A. and Oliveberg M.* Folding of human superoxide dismutase: disulfide reduction prevents dimerization and produces marginally stable monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 15893–15898.
 82. *Liu L., Drouet V., Wu J.W., Witter M.P., Small S.A., Clelland C. and Duff K.* Trans-synaptic spread of tau pathology *in vivo*. *PLoS ONE*, 2012; Epub. Feb 1.
 83. *Luk K.C., Kehm V.M., Zhang B., O'Brien P., Trojanowski J.Q., Lee V.M.* Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative synucleinopathy in mice. *J. Exp. Med.*, 2012; 209: 975–986.
 84. *Luk K.C., Song C., O'Brien P., Stieber A., Branch J.R., Brunden K.R., Trojanowski J.Q., Lee V.M.* Exogenous α -synuclein fibrils seed the formation of Lewybody-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009; 106: 20051–20056.

85. *Marchut A.J. and Hall C. K.* Spontaneous formation of annular structures observed in molecular dynamics simulations of polyglutamine peptides, *Computational Biology and Chemistry*, 2006; 30(3): 215–218.
86. *Margulis B.A., Vigont V., Lazarev V.F., Kaznacheyeva E.V., Guzhova I.V.* Pharmacological protein targets in polyglutamine diseases: mutant polypeptides and their interactors. *FEBS Lett.*, 2013; 587: 1997–2007.
87. *Markossian K.A., Khanova H.A., Kleimenov S.Y., Levitsky D.I., Chebotareva N.A., Asryants R.A., Muronetz V.I., Saso L., Yudin I.K. and Kurganov B.I.* Mechanism of thermal aggregation of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 2006; 45: 13375–13384.
88. *Mattson M.P., Magnus T.* Aging and Neuronal Vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2006; 7(4): 278–294.
89. *Meyer-Luehmann M., Coomaraswamy Bolmont J.T., Kaeser S.C., Kilger S.E., Neuenschwander A., Abramowski D., Frey P., Jaton A.L.* Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science*, 2006; 313: 1781–1784.
90. *Mohamed N.V., Herrou T., Plouffe V., Piperno N., Leclerc N.* Spreading of tau pathology in Alzheimer's disease by cell-to-cell transmission. *Eur. J. Neurosci.*, 2013; 37(12): 1939–48.
91. *Munch C., O'Brien J., Bertolotti A.* Prion-like propagation of mutant superoxide dismutase-1 misfolding in neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, 2011; 108: 3548–3553.
92. *Muronetz V., Barinova K., Stroylova Y., Semenyuk P., Schmalhausen E.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: aggregation mechanisms and impact on amyloid neurodegenerative diseases, *Int J. Biol. Macromol.*, 2016; Epub. May 20.
93. *Naito H. and Oyanagi S.* Familial myoclonus epilepsy and choreoathetosis: hereditary dentatorubral-pallidoluyian atrophy. *Neurology*, 1982; 32 (8): 798–807.

94. *Naletova I., Schmalhausen E., Kharitonov A., Katrukha A., Saso L., Caprioli A., Muronetz V.* Non-native glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase can be an intrinsic component of amyloid structures, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, 2008; 1784: 2052–2058.
95. *Nath S., Agholme L., Kurudenkandy F.R., Granseth B., Marcusson J. and Hallbeck M.* Spreading of neurodegenerative pathology via neuron-to-neuron transmission of β -amyloid. *J. Neurosci.*, 2012; 32: 8767–8777.
96. *Ossato G., Digman M.A., Aiken C., Lukacsovich T., Marsh J.L. and Gratton E.* A two-step path to inclusion formation of huntingtin peptides revealed by number and brightness analysis. *Biophys. J.*, 2010; 98 (12), 3078–3085.
97. *Oz G., Nelson C.D., Koski D.M., Henry P.G., Marjanska M., Deelchand D.K., Shanley R., Eberly L.E., Orr H.T. and Clark H.B.* Noninvasive detection of presymptomatic and progressive neurodegeneration in a mouse model of spinocerebellar ataxiatype 1. *J. Neurosci.*, 2010; 30 (10): 3831–3838.
98. *Paquet S., Langevin C., Chapuis J., Jackson G.S., Laude H., Vilette D.* Efficient dissemination of prions through preferential transmission to nearby cells. *J. Gen.Virol.*, 2007; 88 (2): 706–13.
99. *Park I.H., Arora N., Huo H., Maherali N., Ahfeldt T., Shimamura A., Lensch M.W., Cowan C., Hochedlinger K. and Daley G.Q.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *J. Cell Biol.*, 2008; 134 (5): 877–886.
100. *Paulson H. and Ammache Z.* Ataxia and hereditary disorders. *Neurol. Clin.*, 2001; 19 (3): 759–782.
101. *Persichetti F., Srinidhi J., Kanaley L., Ge P., Myers R.H., D'Arrigo K., Barnes G.T., MacDonald M.E., Vonsattel J.P., Gusella J.F. and Bird E.D.* Huntington's disease CAG trinucleotide repeats in pathologically confirmed post-mortem brains. *Neurobiol. Dis.*, 1994; 1 (3): 159–166.

102. *Perutz M.F., Finch J.T., Berriman J. and Lesk A.* Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99 (8): 5591–5595.
103. *Petkova A.T., Leapman R.D., Guo Z., Yau W.M., Mattson M.P., Tycko R.* Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Science.*, 2005; 307: 262–265.
104. *Poirier M.A., Li H., Macosko J., Cai S., Amzel M. and Ross C.A.* Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277 (43): 41032–41037.
105. *Ponnambalam S. and Baldwin S.A.* Constitutive protein secretion from the trans-Golgi network to the plasma membrane. *Mol. Membr. Biol.*, 2003; 20: 129–139.
106. *Popiel H.A., Burke J.R., Strittmatter W.J., Oishi S., Fujii N., Takeuchi T., Toda T., Wada K. and Nagai Y.* The Aggregation Inhibitor Peptide QBP1 as a Therapeutic Molecule for the Polyglutamine Neurodegenerative Diseases. *J. Amino Acids.*, 2011; Epub. Jun.30.
107. *Quinn N.* Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, 1996; 85(3): 528–529.
108. *Ren P.H., Lauckner J.E., Kachirskaja I., Heuser J.E., Melki R., Kopito R.R.* Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. *Nature Cell Biol.*, 2009; 11: 219–225.
109. *Ross C.A. and Poirier M.A.* What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005; 6: 891–898.
110. *Rub U., Schyfs L., Paulson H., Auburger G., Kermer P., Jen J.C., Seidel K., Korf H.W. and Deller T.* Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Progress in Neurobiology*, 2013; 104: 38–66.

111. *Sakono M. and Zako T.* Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS Journal*, 2010; 277: 1348–1358.
112. *Saman S., Kim W., Raya M., Visnick Y., Miro S., Jackson B., McKee A.C., Alvarez V.E., Lee N.C. and Hall G.F.* Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.*, 2012; 287: 3842–3849.
113. *Sandal M., Valle F., Tessari I., Mammi S., Bergantino E., Musiani F., Brucale M., Bubacco L., Samorì B.* Conformational equilibria in monomeric α -synuclein at the single-molecule level. *PLoS Biol.*, 2008; 6 (1): Epub Jan. 6.
114. *Schulze H., Schuler A., Stüber D., Döbeli H., Langen H., Huber G.* Rat brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with the recombinant cytoplasmic domain of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem.*, 1993; 60: 1915–1922.
115. *Seindler K.A., Seindler N.W.* Role of extracellular GAPDH in *Streptococcus pyogenes* virulence. *Mo. Med.*, 2013; 110: 236–240.
116. *Seindler N.W.* Multiple binding partners. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2013; 985: 249-67.
117. *Shin R.W., Iwaki T., Kitamoto T., Tateishi J.* Hydrated autoclave pretreatment enhances tau immunoreactivity in formalin-fixed normal and Alzheimer's disease brain tissues. *Lab. Invest.*, 1991; 64 (5): 693–702.
118. *Simanainen U., Brogley M., Gao Y.R., Jimenez M., Harwood D.T., Handelsman D.J., Robins D.M.* Length of the human androgen receptor glutamine tract determines androgen sensitivity in vivo. *Mol. Cell Endocrinol.* , 2011; 342 (1-2): 81–86.
119. *Simon D., Garcia-Garcia E., Gomez-Ramos A., Falcon-Perez J.M., Diaz-Hernandez M., Hernandez F. and Avila, J.* Tau overexpression results in its secretion via membrane vesicles. *Neurodegener. Dis.*, 2012; 10: 73–75.

120. *Skarzynksy T., Moody P.C., Wonacott A.J.* Structure of Holo Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å Resolution. *J. Mol. Biol.*, 1987; 193(1): 171–187.
121. *Smalheiser N.R.* Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biol. Direct.*, 2007; 2: 35.
122. *Sokolowski F., Modler A. J., Masuch R., Zirwer D., Baier M., Lutsch G., Moss D. A., Gast K. and Naumann D.* Formation of critical oligomers is a key event during conformational transition of recombinant syrian hamster prion protein. *J. Biol.Chem.*, 2003; 278: 40481–40492.
123. *Soto C.* Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2003; 4(1): 49–60.
124. *Spires T.L., Orne J.D., Santa Cruz K., Pitstick R., Carlson G.A., Ashe K.H. & Hyman B.T.* Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy. *Am.J. Pathol.*, 2006; 168: 1598–1607.
125. *Sugars K.L., Rubinsztein D.C.* Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet.*, 2003, 19: 233–238.
126. *Sun Y., Makarava N., Lee C. I., Laksanalamai P., Robb F. T. and Baskakov I. V.* Conformational stability of PrP amyloid fibrils controls their smallest possible fragment size. *J. Mol. Biol.*, 2008; 376: 1155–1167.
127. *Suzuki K., Zhou J., Sato T., Takao K., Miyagawa T., Oyake M., Yamada M., Takahashi H., Takahashi Y., Goto J. and Tsuji S.* DRPLA transgenic mouse substrains carrying single copy of full-length mutant human DRPLA gene with variable sizes of expanded CAG repeats exhibit CAG repeat length and age-dependent changes in behavioral abnormalities and gene expression profiles. *Neurobiol. Dis.*, 2012; 46 (2): 336–350.
128. *Tanaka F., Katsuno M., Banno H., Suzuki K., Adachi H. and Sobue G.* Current status of treatment of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neural Plast.*, 2012; Epub Jun. 7.

129. *Tarlac V. and Storey E.* Role of proteolysis in polyglutamine disorders. *J. Neurosci. Res.*, 2003; 74 (3), 406–416.
130. *Tarze A., Deniaud A., Le Bras M., Maillier E., Molle D., Larochette N., Zamzami N., Jan G., Kroemer G., Brenner C.* GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene*, 2007; 26 (18): 2606–2620.
131. *Taylor. J.P., Hardy, J. and Fischbeck K.H.* Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, 2002; 296: 1991–1995.
132. *Teplow D.B., Lazo N.D., Bitan G., Bernstein S., Wytttenbach T., Bowers M. T., Baumketner A., Shea J. E., Urbanc B., Cruz L., Borreguero J. and Stanley H. E.* Elucidating amyloid beta-protein folding and assembly: A multidisciplinary approach. *Acc. Chem. Res.*, 2006; 39: 635–645.
133. *Tisdale E.J., Kelly C., Artalejo C.R.* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interacts with Rab2 and plays an essential role in endoplasmic reticulum to Golgi transport exclusive of its glycolytic activity. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279(52): 54046–54052.
134. *Tristan C., Shahani N., Sedlak T.W. and Sawa A.* The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell. Signal.*, 2011; 23: 317–323
135. *Verma M., Vats A. and Taneja V.* Soluble oligomers and fibrillar species of amyloid β -peptide differentially affect cognitive functions and hippocampal inflammatory response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012; 429 (3-4): 125–130.
136. *Violante V., Luongo A., Pepe I., Annunziata S. and Gentile V.* Transglutaminase-dependent formation of protein aggregates as possible biochemical mechanism for polyglutamine diseases. *Brain Res. Bull.*, 2001; 56 (3–4): 169–172.
137. *Visanji N. P., Collingwood J. F., Finnegan M. E., Tandon A., House E. and Hazrati L.-N.* Iron deficiency in parkinsonism: region-specific iron

- dysregulation in Parkinson's disease and multiplesystem atrophy. *J. Parkinsons. Dis.*, 2013; 3: 523–537.
138. *Volpicelli-Daley L.A., Luk K.C., Patel T.P., Tanik S.A., Riddle D.M., Stieber A., Meany D.F., Trojanowski J.Q., Lee V.M.* Exogenous α -Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. *Neuron.*, 2011; 72: 57–71.
 139. *Walker L.C, LeVine H.* 2012. Corruption and spread of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *J Biol. Chem.*, 287:33109–33115.
 140. *Walker L.C., Diamond M.I., Duff K.E. & Hyman B.T.* 2013. Mechanisms of protein seeding in neurodegenerative diseases. *JAMA Neurol.*, 70: 304–310.
 141. *Wang Q., Woltjer R.L., Cimino P.J., Pan C., Montine K.S., Zhang J., Montine T.J.* Proteomic analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer disease identifies GAPDH as a detergent-insoluble paired helical filament tau binding protein. *FASEB J.*, 2005; 19: 869–871.
 142. *Wang Y., Cui J., Sun X. and Zhang Y.* Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ.*, 2011; 18: 732–742.
 143. *Wanker E.E., Rovira, C., Scherzinger E., Hasenbank R., Walter S., Tait D., Colicelli, J. and Lehrach, H.* HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast. Two-hybrid system. *Hum. Mol. Genet.*, 1997; 6 (3): 487–495.
 144. *Wellington C.L., Ellerby L.M., Gutekunst C.A., Rogers D., Warby S., Graham R.K., Loubser O., van Raamsdonk J., Singaraja R., Yang Y.Z., Gafni J., Bredesen D., Hersch S.M., Leavitt B.R., Roy S., Nicholson D.W. and Hayden M.R.* Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.* 2002; 22 (18): 7862–7872.
 145. *Wheeler V.C., Auerbach W., White J.K., Srinidhi J., Auerbach A., Ryan A., Duyao M.P., Vrbanc V., Weaver M., Gusella J.F., Joyner, A.L.*

- and MacDonald M.E.. Length-dependent gametic CAG repeat instability in the Huntington's disease knock-in mouse. *Hum. Mol. Genet.*, 1999; 8 (1): 115–122.
146. White J.K., Auerbach W., Duyao M.P., Vonsattel J.P., Gusella J.F., Joyner L. and MacDonald M.E. Huntingtin is required for neurogenesis and is not impaired by the Huntington's disease CAG expansion. *Nat. Genet.*, 1997; 17 (4): 404–441.
 147. Witan H., Gorlovoy P., Kaya A.M., Koziollek-Drechsler I., Neumann H., Behl C., Clement A.M. Wild-type Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) does not facilitate, but impedes the formation of protein aggregates of amyotrophic lateral sclerosis causing mutant SOD1, *Neurobiol. Dis.*, 2009; 36 (2): 331–42.
 148. Wu J., Lin F., Qin Z.. Sequestration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to aggregates formed with mutant huntingtin. *Acta Biochim Biophys Sin.*, 2007; 39: 885–890.
 149. Wu J.W., Herman M., Liu L., Simoes S., Acker C.M., Figueroa H., Steinberg J.I., Margittai M., Kaye R., Zurzolo C., Di Paolo G. & Duff K.E. Small misfolded tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J. Biol. Chem.*, 2013; 288: 1856–1870.
 150. Xia Y., Saitoh T., Ueda K., Tanaka S., Chen X., Hashimoto M., Hsu L., Conrad C., Sundsmo M., Yoshimoto M., Thal L., Katzman R., Masliah E. Characterization of the human alpha-synuclein gene: Genomic structure, transcription start site, promoter region and polymorphisms. *J. Alzheimers Dis.*, 2002; 3(5): 485–494.
 151. Yamaji K., Wang Y., Liu Y., Abeyama K., Hashiguchi T., Uchimura T., Biswas K. K., Iwamoto H., Maruyama I. Activated protein C, a natural anticoagulant protein, has antioxidant properties and inhibits lipid peroxidation and advanced glycation end products formation. *Thromb. Res.*, 2005; 115: 319–325.

152. Zala D., Hinckelmann M.V., Yu H., Lyra da Cunha M.M., Liot G., Cordelières F.P., Marco S., Saudou F. Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell*, 2013; 152 (3): 479–491.

10. ПРИЛОЖЕНИЕ

Табл. 1. Нейродегенеративные заболевания (Kokalj et al., 2005)

Нейродегенеративное заболевание	Белковый компонент	Клеточные включения	Поражённый участок ЦНС
Болезнь Альцгеймера	tau, милоид β_{1-42}	Нейрофибриллярные клубки	Пирамидальные нейроны лобной доли, гиппокамп и связанные кортикальные и лимбические структуры
Болезнь Паркинсона	α -синуклеин	Нейрофиламенты/цитоплазма	Чёрная субстанция и связанные кортикальные структуры
Деменция с тельцами Леви	α -синуклеин	Тельца Леви/цитоплазма	Кортикальные и субкортикальные нейроны
Болезнь Пика	tau	Тельца Пика/цитоплазма	Лобная, височная и теменная доли головного мозга
Прогрессирующий супрануклеарный паралич	tau	Нейрофибриллярные клубки	Клетки базальных ганглиев головного мозга и ствола мозга
Боковой амиотрофический склероз	Супероксид-дисмутаза	Внутриклеточные включения	Спинальный мозг и прецентральная извилина
Болезнь Хантингтона	Хантингтин с полиглутаминовым трактом	Внутриклеточные включения	Шипиковые нейроны стриатума и связанные кортикальные структуры
Спинаocerebellарная атаксия	Полиглутаминовые тракты атаксинов -1 -3 -7	Внутриклеточные включения	Червь мозжечка, нижние оливы, ядро и поперечные волокна моста мозга
Трансмиссивные губчатые энцефалопатии	Прионный белок	Эндосомоподобные органеллы	Кора больших полушарий головного мозга

Табл.2. Клиническая классификация нейродегенеративных заболеваний
(Пономорёв, 2007)

Поражаемая структура нервной системы	Нейродегенеративное заболевание	Преимущественная форма заболевания
Нейродегенеративные заболевания с преимущественным поражением коры головного мозга	Болезнь Альцгеймера	спорадическая
	Болезнь Пика	спорадическая
	Синдром Миллса	заболевание неясной этиологии
	Первичная прогрессирующая афазия	заболевание неясной этиологии
	Задняя корковая атрофия	наследственная
Нейродегенеративные заболевания с преимущественным поражением базальных ганглиев	Прогрессирующий надъядерный паралич	спорадическая
	Мультисистемная атрофия	спорадическая
	Деменция с тельцами Леви	спорадическая
	Болезнь Гуам	спорадическая
	Кортико-базальная дегенерация	спорадическая
	Болезнь Хантингтона	наследственная
	Болезнь Вильсона-Коновалова	наследственная
	Болезнь Галлервордена-Шпатца	наследственная
	Болезнь Фара	наследственная
	Нейроакантоцитоз	наследственная
Нейрогенеративные заболевания с поражением мозжечка, ствола и спинного мозга	Атаксия Фридрейха	наследственная
	Поздние мозжечковые атаксии	наследственная
	Наследственные спастические параплегии	наследственная
	Боковой амиотрофический склероз	заболевание неясной этиологии

Табл.3. Общая характеристика белков, связанных с нейродегенеративными заболеваниями

Белковый компонент	Общие сведения	Функция в норме
Белки tau (τ белки)	Являются продуктом альтернативного сплайсинга одного гена <i>MARt</i> В зависимости от изоформ, имеет различный молекулярный вес: 45,9 кДа; 42,6 кДа; 42,9 кДа; 40 кДа; 39,7 кДа; 6,8 кДа.	Поддержание стабильности аксональных микротрубочек (Shin et al, 1991)
Амилоид-бета (A β , или Abeta)	Формируется после последовательного расщепления белка-предшественника амилоида (APP), в результате последовательного действия β и γ секретаз. APP и может генерировать ряд изоформ из 36-43 аминокислотных остатков (Aragate, 1999). Молекулярный вес: 4-4,5 кДа	Функции до конца не известны, A β вовлечен в активацию киназ, участвует при защите от окислительного стресса, регулировании транспорта холестерина, функционирует как транскрипционный фактор и обладает противомикробной активностью (Hartmann et al, 1997; Bogoyevitch, 2004)
Альфа-синуклеин (α -синуклеин)	Имеет три изоформы, являющиеся продуктом альтернативного сплайсинга. Полномерная изоформа, состоит из 140 аминокислот. Другие изоформы получают в результате Fändrich, 2012) потери экзона 3 (отсутствуют остатки 41-54) или экзона 5 (отсутствуют остатки 103-130). Молекулярный вес: 14,5 кДа	Взаимодействует с тубулином, участвует в функционировании аппарата Гольджи, в транспорте везикул в нейронах и имеет важное значение для нормального развития когнитивных функций (Xia, 2002).

Продолжение табл.3. Общая характеристика белков, связанных с нейродегенеративными заболеваниями

Белковый компонент	Общие сведения	Функция в норме
Супероксиддисмутаза (SOD, СОД)	Существует несколько формСОД, различающихся по кофактору металла в реакционном центре: Cu/Zn (эукариоты), Fe или Mn (прокариоты, протисты и митохондрии эукариот), и Ni (прокариоты) (Sandal et al, 2008). Молекулярный вес: 16 кДа	Играет роль антиоксиданта (BorgstahlGE, 1992)
Хантингтин (гентингтин, Htt)	Кодируется полиморфным геном <i>HTT</i>, Из-за полиморфизма гена, конечный белок может иметь различное число остатков глутамина. Молекулярная масса зависит от количества остатков глутамина. Нормальная длина хантингтина, составляет 3144 аминокислот, что составляет около 350 кДа (Assfalg et al, 2003)	Точная функция неизвестна, вовлечен в сигнализацию, транспорт, участвует при связывании белков и других структур (митохондрий), а также замечен в защитных механизмах от запрограммированной гибели клеток (апоптоз), необходим для нормального эмбрионального развития. (Lindberg et al, 2004; Leal et al, 2013)
Атаксины (ataxin)	Ядерные белки, встречающиеся во всех клетках организма. Выделяют несколько форм: атаксин-1, атаксин-3, атаксин-7, кодирующиеся генами <i>ATXN1</i>, 3, 7 соответственно. Молекулярная масса различна в зависимости от форм - 42-98 кДа.	Функция атаксина-1 неизвестна. Предполагается, что участвует в трансляции белков. Атаксин-3 участвует в убиквитин-протеасомной системе. Атаксин-7 функционирует как часть 2-х транскрипционных репрессорных комплексов: STAGA комплекса и TATA-ВР свободного TAF-содержащего комплекса (Marchut and. Hall, 2006; Chanez-Cardenas and Vazquez-Contreras, 2012)

Окончание табл.3. Общая характеристика белков, связанных с нейродегенеративными заболеваниями

Белковый компонент	Общие сведения	Функция в норме
рионный белок (prionprotein, PrP)	Кодируется геном <i>PRNP</i> (PRioN Protein). Имеет несколько изоформ. PrP^C, нормальный белок, локализован на мембранах клеток и встречается у здоровых людей и животных. Он имеет 209 аминокислот (у человека), одну дисульфидную связь и, главным образом, α-спиральную структуру. PrP^C имеет несколько топологических форм: одна поверхностная форма, закоренная через гликолипид, и две трансмембранные формы. Молекулярная масса 35-36 кДа. Инфекционная изоформа обозначается как PrP^{Sc} и способна конвертировать нормальные PrP^C белки в инфекционные. PrP^{Sc} всегда вызывает прионные заболевания. Точная трехмерная структура PrP^{Sc} неизвестна, но она имеет более высокую пропорцию β-складчатой структуры вместо α-спиралей. Конец каждой фибрилы действует как шаблон, на который могут прикрепляться свободные молекулы белка, позволяя фибрилле расти. (Baker et al, 1996)	PrP^C связывает ионы меди (II) с высоким сродством. PrP^C легко подвергается протеолизу протеиназой К и снимается с поверхности клетки <i>in vitro</i> с помощью фермента фосфоинозитид фосфолипаза С (PI-PLC), которая расщепляет гликофосфатидилинозитол (GPI) гликолипидный якорь (Aguzzi, 2008). Другие исследования показывают, что PrP играет важную роль в межклеточной адгезии и внутриклеточной сигнализации <i>in vivo</i>, и, следовательно, может быть вовлечен в межклеточные связи в головном мозге (Liao et al, 1986).

БЛАГОДАРНОСТИ

Я приношу глубокую благодарность моему научному руководителю зав. Лабораторией защитных механизмов клетки д.б.н. Ирине Владимировне Гужовой, а также и.о. зав. Отдела клеточных культур д.б.н. Борису Александровичу Маргулису за предоставленную возможность заниматься данной темой, внимательное отношение и помощь в работе.

Искренне благодарна научному сотруднику нашей лаборатории к.б.н. Лазареву Владимиру Фёдоровичу и аспирантке Никотиной Алине Дмитриевне за помощь в освоении биохимических, цитологических и гистологических методов ив организации экспериментов.

Я сердечно благодарна всем сотрудникам Лаборатории защитных механизмов клетки за создание творческой, теплой и дружелюбной атмосферы.

Также я безгранично благодарна своим родителям, Татьяне Михайловне и Радиславу Ивановичу, за любовь, поддержку и сопереживание.

За поддержку и ценные советы я выражаю признательность своим близким друзья: Лысковой Татьяне и Коршуновой Ирине.