

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

РЯЗАНЦЕВА

Мария Андреевна

НАРУШЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ  
КАНАЛОВ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

03.03.04

Клеточная биология, цитология, гистология

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание ученой степени

Кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,

Е.В. Казначеева

Санкт-Петербург

2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	5
ВВЕДЕНИЕ .....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1. Болезнь Альцгеймера .....	15
1.2. Гены, связанные с болезнью Альцгеймера .....	19
1.2.1. Белок предшественник амилоида (APP) .....	20
1.2.2. Пресенилины (PS) и гамма-секретаза .....	22
1.2.3. Другие гены, связанные с болезнью Альцгеймера .....	27
1.3. Модели болезни Альцгеймера <i>in vivo</i> .....	32
1.4. Амилоидная гипотеза развития болезни Альцгеймера .....	38
1.5. Наследственная болезнь Альцгеймера и спорадическая болезнь Альцгеймера .....	43
1.6. Терапия болезни Альцгеймера .....	44
1.7. Кальциевая гипотеза патологии болезни Альцгеймера .....	48
1.8. Депо-управляемые кальциевые каналы .....	51
1.9. Нарушения депо-управляемого входа в патологии заболеваний ЦНС .....	61
1.10. Ингибиторы депо-управляемого кальциевого входа .....	65
1.10.1. Лантаноиды .....	65
1.10.2. Соединения имидазола .....	66
1.10.3. Соединения дифенил бората .....	66
1.10.4. Соединения пиразола: ВТР .....	68
1.10.5. Соединения пиразола: Руг .....	69
1.10.6. Соединения пиразола: GSK .....	69
1.10.7. Synta 66 .....	70
1.10.8. ML-9 .....	71
1.10.9. Диэтилстилбестрол .....	71
1.10.10. Карбоксиамидотриазол .....	71
1.10.11. RO2959 .....	72
1.10.12. Линолевая кислота .....	72
1.10.13. Производные 1-фенил-3-(1-фенилэтил)мочевины .....	73
1.10.14. Ингибиторы компании CalciMedica .....	74
1.10.15. EVP4593 .....	75
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	76

2.1.	Материалы. ....	76
2.2.	Клетки и трансфекция. ....	76
2.3.	Мыши. ....	77
2.4.	Получение первичной культуры нейронов гиппокампа. ....	78
2.5.	Получение ленти-вируса и инфицирование нейронов. ....	78
2.6.	Исследование передвижения внутриклеточных белков. ....	81
2.7.	Измерение внутриклеточной динамики кальциевых концентраций. ....	81
2.8.	Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp). ....	82
2.9.	Получение лизатов клеток. ....	84
2.10.	Электрофорез белков и иммуноблоттинг. ....	84
2.11.	Ко-иммунопреципитация. ....	85
2.12.	Клонирование последовательности человеческого гена белка PS1 в вектор рUAST. 86	
2.13.	Создание трансгенных линий дрозофил. ....	88
2.14.	Линии <i>Drosophila melanogaster</i> , использованные в данной работе. ....	89
2.15.	Фенотипический анализ экспрессии генов <i>mini-white</i> в трансгенных линиях. ....	90
2.16.	Генетические скрещивания. ....	91
2.17.	Условия содержания дрозофил. ....	93
2.18.	Регистрация поведения ухаживания. ....	93
2.19.	Кормление дрозофил питательной смесью с 2-APB. ....	95
2.20.	Статистический анализ. ....	95
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ. ....	96
3.1.	Фармакологическое ингибирование эндопротеолиза PS1 влияет на депо-управляемый вход кальция в клетках Neuro2a. ....	98
3.2.	Увеличение уровня полноразмерного белка PS1 при экспрессии неактивного PS1 D257A в клетках мышечных фибробластов MEF с двойным нокаутом генов белков PS1 и PS2 усиливает депо-управляемый вход кальция. ....	100
3.3.	Подавление эндопротеолиза PS1 вызывает усиление активации депо-управляемых кальциевых каналов клетках Neuro2a. ....	101
3.4.	Увеличение отношения полноразмерного PS1 к его терминальному фрагменту увеличивает $I_{SOC}$ в клетках Neuro2a. ....	106
3.5.	Гиперактивация депо-управляемых кальциевых каналов в клетках Neuro2a, вызванная накоплением полноразмерного PS1, не является следствием изменений уровней экспрессии основных белков, определяющих депо-управляемый вход кальция. ....	108
3.6.	Пониженный уровень эндопротеолиза PS1 усиливает активацию депо-управляемых каналов в нейронах гиппокампа мыши. ....	111
3.7.	Создание клеточных моделей наследственной БА. ....	112

3.8. Каналы, образованные белками TRPC1 и Orai1, формируют депо-управляемые кальциевые каналы в нейронах гиппокампа мыши. ....	114
3.10. Экспрессия PS1 ΔE9 увеличивает амплитуду I <sub>SoC</sub> в нейронах гиппокампа мыши. ....	116
3.11. Экспрессия PS1 ΔE9 увеличивает амплитуду I <sub>SoC</sub> и усиливает перемещение сенсоров STIM1 к плазматической мембране в клетках Neuro2a. ....	119
3.13. Понижение экспрессии STIM1 восстанавливает амплитуду I <sub>SoC</sub> до контрольных значений в нейронах гиппокампа мыши, экспрессирующих PS1 ΔE9. ....	124
3.13. Трансгенные <i>Drosophila melanogaster</i> , экспрессирующие мутантный ген PS1 ΔE9 в холинэргических нейронах, демонстрирует зависимость от возраста потерю кратковременной памяти. ....	127
3.14. Ингибитор депо-управляемых кальциевых каналов 2-APB предотвращает потерю кратковременной памяти у трансгенных <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	130
3.15. Активность депо-управляемых каналов, образованных субъединицами Orai, может быть связана с чувствительностью нейронов к окислительному стрессу. ....	132
4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	135
4.1. Изменения в активности каналов при повышении уровня неразрезанного белка PS1 связаны с уровнем его эндопротеолиза, но не связаны с активностью γ-секретазы и с уровнем Aβ. ....	135
4.2. Изменения в активности депо-управляемых каналов может быть связано с патологией наследственной БА. ....	136
4.3. Сенсор STIM1 является ключевым переносчиком патологического сигнала к депо-управляемым каналам и вызывает их гиперактивацию. ....	137
4.4. Трансгенные <i>Drosophila melanogaster</i> с экспрессией мутантного гена человека PS1 ΔE9 в холинэргической нервной системе демонстрируют потерю кратковременной памяти. ....	139
4.5. Производные 2-APB могут использоваться для разработки новых потенциальных лекарственных препаратов для лечения нейродегенерации при НБА. ....	140
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	141
ВЫВОДЫ .....	142
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ. ....	143

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A $\beta$	бета-амилоид
AMPA	$\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота
APP	белок предшественник амилоида
BAPTA	1,2-бис(2-аминофенокси)этантетрауксусная кислота
CRAC	«Ca <sup>2+</sup> release-activated Ca <sup>2+</sup> current» («активируемый высвобождением кальция кальциевый ток»)
Ca <sup>2+</sup>	свободные ионы кальция
EGTA	этиленгликольтетрауксусная кислота
Htt	хантингтин (белок)
I <sub>CRAC</sub>	ток через каналы CRAC
I <sub>min</sub>	миниатюрные кальциевые каналы
I <sub>max</sub>	большие кальциевые каналы
I <sub>ns</sub>	неселективные каналы
IP3	инозитол-1,4,5-трифосфат
IP3R	рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата
I <sub>soc</sub>	ток через депо-управляемые каналы
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B (ядерный фактор $\kappa$ B)
NMDA	N-метил-D-аспаратат
NMDG	N-метил D-глюкамин

PIP2	фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
PIP3	фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат
PKC	протеинкиназа C
PLC	фосфолипаза C
PS	пресенилин
RyR	рецептор рианодина
SERCA	кальциевые АТФазы эндо(сарко)плазматического ретикулума
SOC	«store-operated channel» («депо-управляемый канал»)
STIM	stromal interaction molecule
Tg	тапсигаргин
TPEN	N,N,N',N'-тетракис (2-пиридилметил) этилен диамин
TRPC	«transient receptor potential canonical» (« канонический временный рецепторный потенциал»)
БА	болезнь Альцгеймера
НБА	Наследственная болезнь Альцгеймера
ПМ	плазматическая мембрана
ЦНС	центральная нервная система
ЭР	эндоплазматический ретикулум

## ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Актуальность проблемы определяется ее социальной и экономической значимостью. Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием среди людей старше 60-ти лет. Результаты проведенного популяционного исследования в Научно-методическом центре по изучению болезни Альцгеймера и ассоциированных с ней расстройств НЦПЗ РАМН показали, что на долю БА с поздним началом приходится почти половина случаев деменции в пожилом возрасте (Калын и соавт., 2001). БА характеризуется потерей синапсов и массовой гибелью нейронов в области коры больших полушарий и гиппокампа. Симптомами БА являются потеря памяти и когнитивных способностей. Этиология БА до конца не изучена, в связи с этим не существует эффективного лечения (Bekris et al., 2010). В последнее десятилетие нарушение кальциевого гомеостаза в нейронах рассматривается как одно из ключевых событий при развитии патологии БА и других нейродегенеративных заболеваний, поэтому элементы кальциевой сигнализации в нейронах представляют собой привлекательную мишень для разработки новых фармакологических агентов для лечения (Berridge, 2010). В основе процессов памяти лежат такие механизмы синаптической пластичности как долговременная потенция (LTP) и долговременная депрессия (LTD). Данные механизмы напрямую зависят от регуляции кальциевого гомеостаза в нейронах и запускаются под контролем изменений концентрации кальция в цитоплазме (Harney et al., 2006). Гибель клеток в результате апоптоза, аутофагии или окислительного стресса также регулируется сигнальными каскадами, связанными с изменениями концентрации кальция в цитоплазме (Harr et al., 2010; Henke et al., 2013). Нарушения активности различных типов кальциевых каналов и регуляции внутриклеточной концентрации кальция были показаны непосредственно в

клетках пациентов с БА (Ito et al., 1994; Jaworska et al., 2013). Большинство случаев наследственной формы БА (НБА) вызвано мутациями в гене пресенилин-1 (PS1) (Bekris et al., 2010). Недавние исследования показали, что, по всей видимости, к нарушениям кальциевого гомеостаза приводит накопление полноразмерного белка PS1, который в результате мутаций снижает способность к эндопротеолизу (Honarnejad et al., 2013). В последние несколько лет особое внимание уделяется кальциевым каналам, как новым возможным мишеням для разработки лекарственных препаратов в терапии БА, с целью устранения патологических состояний, связанных с нарушениями кальциевого гомеостаза (Oulès et al., 2012; Anekonda et al., 2011; Henke et al., 2013; Shilling et al., 2014). В частности, было обнаружено, что в лимфоцитах пациентов с БА увеличена активность депо-управляемых кальциевых каналов (Jaworska et al., 2013). Изучение механизмов данных нарушений является приоритетной задачей фундаментальной медицины, решение которой связано с созданием и совершенствованием животных и клеточных моделей БА. Использование подобных моделей дает возможность не только исследовать молекулярную природу заболевания, но и на основе полученных данных проводить направленное тестирование потенциальных лекарственных препаратов.

Стимуляция рецепторов, сопряженных с G-белками и тирозиновыми киназами, в нейронах приводит к активации фосфолипазы C и последующему гидролизу инозитол-4,5-бисфосфата с образованием диацилглицерина и инозитол-1,4,5-трифосфата. При стимуляции рецептора инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3R) и/или рианодинового рецептора (RyR) в мембране эндоплазматического ретикулума происходит выход кальция через катионный канал соответствующего рецептора. Снижение концентрации свободного кальция в просвете эндоплазматического ретикулума, так называемое опустошение кальциевого депо, приводит к активации кальциевых каналов в плазматической мембране и входу кальция в клетку из внеклеточной среды.

Данный процесс называется депо-управляемым кальциевым входом, а кальциевые каналы, активирующиеся в ответ на опустошение кальциевых депо, называются депо-управляемыми каналами (Parekh et al., 2005; Putney, 2005). Сигнал о снижении концентрации кальция в ЭР передается к каналам в ПМ за счет кальциевых сенсоров – белков STIM1 и STIM2. Эти белки локализованы в мембране ЭР и реагируют на уменьшение концентрации кальция в ЭР, изменяя свою конформацию, что позволяет им связываться с каналами в ПМ и приводить их в активное состояние. Основными субъединицами депо-управляемых каналов являются белки семейства TRPC и белки Orai (Smyth, 2010). Нарушения работы депо-управляемых кальциевых каналов связывают с рядом нейродегенеративных заболеваний: болезнь Паркинсона (Selvaraj et al., 2009), болезнь Альцгеймера (Yoo et al., 2000) и латеральный амиотрофический склероз (Kawamata et al., 2014). Выяснение механизмов их активации в норме и патологии, а также поиск возможных фармакологических агентов, влияющих на их активность, таким образом, поможет разгадать механизмы патологий сразу нескольких нейродегенеративных заболеваний.

Цель исследования. Данное исследование направлено на разработку клеточных и трансгенных животных моделей болезни Альцгеймера для выявления нарушений в активности кальциевых каналов и регуляторов внутриклеточной концентрации кальция, связанных с патологией, и создания научного задела в области разработки новых фармакологических агентов для терапии данного заболевания.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие конкретные задачи исследования.

- Задача 1. Создание клеточных моделей й болезни Альцгеймера с экспрессией мутантных генов, вызывающих наследственную форму этого заболевания (НБА), и выявление нарушений регуляции кальциевого гомеостаза.

- Задача 2. Поиск молекулярных механизмов лежащих в основе выявленных патологических изменений в регуляции кальциевого гомеостаза, и поиск возможной молекулярной мишени для потенциального лекарственного препарата и фармакологических агентов на роль лекарственного препарата.
- Задача 3. Создание трансгенной модели болезни Альцгеймера на основе *Drosophila melanogaster* со вставками мутантных генов человека и выявление ее патологического фенотипа.
- Задача 4. Тестирование фармакологических агентов, действующих на молекулярные мишени для устранения патологического фенотипа модели болезни Альцгеймера на основе *Drosophila melanogaster*.

Научная новизна. Выявлены изменения в регуляции кальциевого гомеостаза, происходящие под влиянием экспрессии генов, ассоциированных с БА. Впервые описано влияние мутаций в гене пресенилин-1, приводящих к накоплению полноразмерного белка в нейронах, на депо-управляемые кальциевые каналы. Проведен анализ экспрессии основных генов белков, детерминирующих активность депо-управляемых кальциевых каналов (белки семейства TRPC, белок Orai1, белки STIM1 и STIM2, IP3R), который впервые показал, что изменение активности депо-управляемых кальциевых каналов при наследственной БА вызваны функциональными изменениями в их регуляции, а не изменением в уровне экспрессии генов. С использованием специфических shRNA и конфокальной микроскопии на живых клетках впервые выявлена непосредственная роль сенсорных белков эндоплазматического ретикулума STIM в патологических изменениях регуляции концентрации кальция в клетках. Впервые обнаружено патологическое изменение в проведении сигнала от ЭР к кальциевым каналам в плазматической мембране кальциевыми сенсорами STIM. На основании полученных данных сделано предположение о том, что сенсоры STIM могут служить молекулярными мишенями, фармакологическое воздействие на которые могло бы устранять нарушения кальциевого гомеостаза в нейронах

при наследственной БА. Впервые проведено тестирование фармакологического агента 2-APB в качестве потенциального лекарственного препарата для терапии наследственной БА на трансгенной *Drosophila melanogaster*, которое показало его эффективность в восстановлении нарушений кратковременной памяти.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Усиление активации депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных моделях НБА происходит при накоплении полноразмерного белка PS1 и не связана с изменениями уровня экспрессии основных каналообразующих и регуляторных белков депо-управляемого входа кальция.
- Патологические изменения активности депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных моделях НБА происходят за счет гиперактивации кальциевых сенсоров STIM1.
- Экспрессия мутантного человеческого белка PS1 DE9 в нейронах холинэргической нервной системы трансгенных *Drosophila melanogaster* приводит к нарушениям кратковременной памяти.
- Ингибитор депо-управляемых кальциевых каналов 2-APB, действующий на сенсоры STIM1, восстанавливает функцию памяти в трансгенных *Drosophila melanogaster*, экспрессирующих мутантный человеческий белок PS1 DE9 в нейронах холинэргической нервной системы.

Теоретическая и практическая значимость. Потенциальными потребителями научного результата могут быть профильные компании (как отечественные, так и зарубежные) в области медицинской биотехнологии и доклинической разработки лекарств (эта часть работы может быть осуществлена в России на базе отечественных центров по доклиническим испытаниям лекарственных средств). В качестве продукта исследования можно рассматривать разработанные клеточные и животные модели, которые возможно использовать как для тестирования потенциальных лекарственных

препаратов и разработки новых лекарственных препаратов, так и для дальнейших исследований заболевания. Полученные результаты делают возможным предположение о роли производных вещества 2-APB в качестве потенциального лекарственного препарата для устранения нарушений памяти у пациентов с наследственной формой болезни Альцгеймера. Данное предположение может стать отправной точкой для доклинических испытаний на трансгенных мышинных моделях, которые, в свою очередь, могут дать основу для проведения клинических испытаний. Более того, полученный опыт в исследовании болезни Альцгеймера на клеточных и животных моделях, а также полученные данные могут быть использованы в исследованиях других нейродегенеративных заболеваний.

Личный вклад автора. Результаты, включенные в работу, получены лично автором. Материалы, вошедшие в диссертацию, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Апробация работы. Результаты исследования представлены на Первой международной встрече «Ion Channel Signaling Mechanisms: From Basic Science to Clinical Application» (Марракеш, Марокко, 2011), XIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2012» (Москва, Россия, 2012), Международной Пушинская школе-конференции молодых ученых БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА (Пушино, Россия, 2012 и 2013 гг.), Русско-Немецком Симпозиуме «Molecular Neurobiology Today and Tomorrow» (Москва, Россия, 2012), III и IV конференции молодых ученых Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия, 2012 и 2014), Международной конференции «Alzheimer's and Parkinson's Disease AD/PD 2013» (Флоренция, Италия, 2013), XVI Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА И КЛИНИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНА» (Санкт-Петербург, Россия, 2013), на Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», (Пушино, Россия, 2013), на 38-ом и 39-ом конгрессах федерации европейских

биохимических обществ (FEBS EMBO) (Санкт-Петербург, Россия, 2013 и Париж, Франция, 2014), Региональной встрече Федерации Европейских Сообществ по Нейронаукам (FENS) (Прага, Чехия, 2013), Русско-Немецком Симпозиуме: «Molecular mechanisms of neurodegeneration» (Берлин, Германия, 2014), на 9ом Форуме Федерации Европейских Сообществ по Нейронаукам (FENS) (Милан, Италия, 2014), Форуме Европейского Кальциевого Сообщества (ECS) (Экс-эн-Прованс, Франция, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, 3 из которых статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций (в том числе 3 статьи в международных журналах), 8 тезисов докладов.

1. Henke, N. The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress / P. Albrecht, I. Bouchachia, M. Ryazantseva, K. Knoll, J. Lewerenz, E. Kaznacheyeva, P. Maher, A. Methner // *Cell Death Dis* – 2013. – V. 4. – e470.

2 Ryazantseva, M. Attenuated presenilin-1 endoproteolysis enhances store-operated calcium currents in neuronal cells / K. Skobeleva, L. Glushankova, E. Kaznacheyeva // *J Neurochem.* – 2016. – V. 136. – N. 5. – P. 1085-1095.

3. Ryazantseva, M. Presenilin-1 Delta E9 Mutant Induces STIM1-Driven Store-Operated Calcium Channel Hyperactivation in Hippocampal Neurons / A. Goncharova, K. Skobeleva, M. Erokhin, A. Methner, P. Georgiev, E. Kaznacheyeva // *Mol Neurobiol.* – 2017. – doi: 10.1007/s12035-017-0674-4.

Тезисы.

1. Ryazantseva, M. Disregulation of Calcium Homeostasis Connected with Familial Alzheimer's Disease / K. Skobeleva, E. Kaznacheyeva // *Biophysical Journal* – 2014. – V. 106. – N. 2. – P. 548a-549a.

2. Ryazantseva M. STIM sensors as molecular targets for memory loss treatment connected with calcium homeostasis impairments in Familial Alzheimer's Disease / K. Skobeleva, A. Panova, L. Glushankova, N. Kamyshev, E. Kaznacheeva // FEBS Journal – 2014. – V. 281. – N. 1. – P. 381-382.
3. Skobeleva, K. The M146V mutation in presenilin-1 gene causes disruption of calcium homeostasis / M. Ryazantseva, E. Kaznacheeva // FEBS Journal – 2014. – V. 281. – N. 1. – P. 385.
4. Ryazantseva, M. Mutations in presenilin-1 gene linked with Alzheimer's disease cause impairments in calcium channels functions in neurons / S. Lvovskaya, I. Pozdnyakov, L. Glushankova, I. Bezprozvanny, E. Kaznacheeva // FEBS Journal – 2012. – V. 279 – Suppl. 1. – P. 367.
5. Ryazantseva, M. Familial Alzheimer's disease mutations in presenilin-1 and store-operated calcium entry / L. Glushankova, I. Pozdnyakov, I. Bezprozvanny, E. Kaznacheeva // Biophysical Journal – 2011. – V. 100. – N. 3. – P. 554a.
6. Ryazantseva, M. Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutations affect calcium channels activity: gain and loss / K. Skobeleva, O. Magnes, E. Kaznacheeva // FENS Featured Regional Meeting 11–14 September 2013 Prague Abstract book – 2013. – P. 195.
7. Ryazantseva, M. Familial Alzheimer's disease PS1 gene mutants affect activity of calcium channels differently / K. Skobeleva, O. Magnes, L. Glushankova, E. Kaznacheeva // FEBS Journal – 2013. – V. 280. – Suppl. 1 – P. 419-420.
8. Ryazantseva, M. Presenilin-1 Mutants Connected with Familial Alzheimer's Disease affect Activity of Voltage-Gated Calcium Channels / K. Skobeleva, V. Vigont, L. Glushankova, E. Kaznacheeva // Biophysical journal – 2013. – V. 104. – N. 2. – P. 460A

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Болезнь Альцгеймера.

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием среди людей старше 60-ти лет. Результаты проведенного популяционного исследования в Научно-методическом центре по изучению болезни Альцгеймера и ассоциированных с ней расстройств НЦПЗ РАМН показали, что на долю БА с поздним началом приходится почти половина случаев деменции в пожилом возрасте (Калын и соавт, 2001). БА приводит к инвалидности в пожилом возрасте чаще, чем инсульт, сердечные заболевания и рак (Ballard et al., 2011). Болезнь Альцгеймера (БА) – необратимое, прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся постепенной потерей памяти и когнитивных способностей. Первым симптомом болезни Альцгеймера является неспособность запомнить недавние события, в то время как память о событиях далекого прошлого остается невредимой. С прогрессией заболевания происходит утрата языковых навыков и таких способностей как абстрактное мышление и принятие решений. Степень нарушения различных когнитивных способностей на ранних стадиях может варьировать у разных пациентов, в зависимости от формы заболевания (наследственной или спорадической, с ранним или поздним проявлением симптомов) и от их образа жизни (умственный труд, социальная активность, физическая активность и питание) (Bekris et al. 2010; Ballard et al., 2011). Потерю памяти также сопровождают такие симптомы как изменение личности и аффективные состояния, редко сопровождаемые бредом и галлюцинациями. Неврологические симптомы, встречающиеся на поздних стадиях, включают гипертонию, недержание,

клонический спазм мышц, эпилептические припадки и полную немоту. В конечном счете, пациенты с БА оказываются прикованными к постели, не способными позаботиться о своих естественных нуждах. Продолжительность болезни в среднем составляет 8-10 лет, с момента диагностирования заболевания продолжительность жизни варьирует от 2-х до 25-ти лет. Смерть в большинстве случаев наступает от полного истощения или пневмонии (Bekris et al., 2010).

Прогресс заболевания связан с обширной потерей синапсов и гибелью нейронов в области гиппокампа и коры больших полушарий. При БА происходит значительная атрофия гиппокампа (более 60% нейронов в СА1 секторе). Массовое отмирание нейронов происходит также в неокортексе. В коре большие и средние пирамидальные нейроны являются наиболее уязвимыми. До 90% нейронов гибнет в энторинальной области коры больших полушарий, верхней височной извилине и надкраевой извилине. Смерть нейронов происходит также в обонятельной луковице, миндалевидном теле, голубоватом пятне и серотонинэргических ядрах шва (Duysckaerts et al. 2009).

Этиология болезни Альцгеймера до конца не изучена. Причины развития этого заболевания не до конца ясны. Существует наследственная форма этого заболевания, которая связана с мутациями в ряде генов. Однако наследственная форма составляет в общей сложности не более 10% всех случаев БА. На данный момент известны факторы риска развития БА. Основные риски описаны в базе <http://www.alzrisk.org/default.aspx>, которая содержит большое количество данных о БА, включая данные о трех главных факторах риска: возраст, генетическая предрасположенность и травма головы. Мета-анализ и систематический обзор показали небольшую вероятность того, что «когнитивный резерв» (понятие включающее пользу образования, рода деятельность и ментальной активности) (Valenzuela et al., 2006), физическая активность и упражнения (Hamer et al., 2009), ожирение (Beydoun et al., 2008), прием алкоголя (снижает риск) (Anstey et al., 2009) и курение (повышает риск) (Lee et al., 2010) – это наиболее важные факторы, влияющие на увеличение или

уменьшение риска БА. Данные нескольких эпидемиологических исследований в Швеции предполагают, что социальная активность и социальные связи могут быть ассоциированы с пониженным риском БА (Ballard et al., 2011). Однако, не смотря на очевидную пользу когнитивной нагрузки у пожилых людей, различные тренировки мозга в виде игр не дают снижения риска заболевания для людей возрасте около 60-ти лет (Papp et al., 2009; Valenzuela et al., 2009; Owen et al., 2010).

Некоторые заболевания также связаны с риском БА: инсульт, диабет, гипертензия и повышенный уровень холестерина. Интересно, что уровень холестерина и повышенное давление влияют на риск преимущественно в среднем возрасте (Qiu et al., 2005; Lu et al., 2009; Savva et al., 2010). Тем не менее, в рандомизованных контролируемых клинических испытаниях не было обнаружено положительных эффектов от приема статинов или антигипертензивных препаратов. Однако данные этих клинических испытаний подвергаются критике из-за допущенных методологических ошибок (Ballard et al., 2011). Не существует сколько-либо серьезных данных о том, что прием витаминов или антиоксидантов может существенно снизить риск БА (Malouf et al., 2008; Ravalia et al., 2008), но некоторые исследования показали потенциальную роль так называемой Средиземноморской диеты в уменьшении риска БА (Scarmeas et al., 2006). В реальности многие факторы риска БА перекрываются, таким образом, наиболее многообещающим подходом является более широкое внедрение здорового образа жизни, с сильным уклоном в сторону физических нагрузок, а также своевременной терапии заболеваний, увеличивающих риск БА (Ballard et al., 2011).

Диагностика БА также является трудной задачей. Самый простой и надежный способ диагностики – это посмертное вскрытие с подтверждением изменений головного мозга, включающим потерю нервной ткани и также наличие белковых отложений. До сих пор этот способ является единственным достоверным способом диагностики БА. С связи с этим продолжаются активные исследования, направленные на выявление маркеров заболевания на

ранних стадиях БА (Ballard et al., 2011). На данный момент существует несколько признаков, по которым диагностируют БА. Главным признаком является наличие ранних и значительных нарушений памяти, которые включают в себя следующие характеристики:

1. Постепенные и прогрессирующие изменения в функции памяти, которые длятся не менее 6 месяцев.
2. Объективные доказательства нарушенной эпизодической памяти, показанные в тестах: дефицит запоминания, который не улучшается значительно или не нормализуется с помощью подсказок, дефицит узнавания после предыдущего эффективного запоминания под контролем.
3. Эпизодические нарушения памяти ассоциированы с другими когнитивными нарушениями характерными для начала заболевания (потеря языковых навыков, ориентации, способности суждения и др.).

Дополнительные критерии включают:

1. Атрофия медиальной височной доли, потеря объема гиппокампа, энторинальной коры или голубоватого пятна на МРТ.
2. Появление маркеров заболевания в спинномозговой жидкости: низкий уровень A $\beta$ 42 (амилоида-бета 1-42), увеличение концентрации фосфорилированного и общего tau белка.
3. Специфический паттерн изменения метаболизма глюкозы в билатеральной височной и теменной областях, детектированный с помощью функциональной нейровизуализации с ПЭТ (Позитронной Эмиссионной Томографии).
4. Наличие аутомсомальной доминантной мутации, связанной с БА у родственников пациента.

Для диагностики используют обязательное наличие главного признака, включающего все три характеристики, и одного-двух дополнительных (Bekris et al., 2010; Dubois et al., 2007). Для точной диагностики должны быть исключены такие причины нарушения памяти, как нарушения работы

щитовидной железы, дефицит витаминов группы В, депрессия, инфекции нервной системы, опухоли в мозге и другие заболевания нервной системы (Bekris et al., 2010).

Одним из главных диагностических признаков БА является одновременное наличие нейрофибриллярных узелков и амилоидных бляшек в тканях головного мозга. Главный компонент амилоидных бляшек – амилоид-бета (Аβ). Аβ образуется в результате разрезания трансмембранного белка предшественника амилоида (APP) ферментами секретазами. Существует несколько изоформ Аβ у человека – пептиды длиной от 38 до 42 аминокислот. Наиболее распространены пептиды длиной 40 аминокислот (Аβ40) и пептиды длиной 42 аминокислоты (Аβ42). Оба типа пептидов способны олигомеризоваться и образовывать нерастворимые амилоидные бляшки, но Аβ42, тем не менее, более склонен к олигомеризации. Изоформы Аβ40 и Аβ42 также встречаются у человека в норме и образуют амилоидные бляшки в стареющем мозге. Однако в мозге пациентов с БА происходит более интенсивное образование амилоидных бляшек. Распределение бляшек в мозге не является случайным и зависит от стадии заболевания: преимущественно поражаются неокортекс и гиппокамп (Goedert et al., 2006). При БА происходит либо изменение соотношения Аβ42:Аβ40 за счет увеличения количества фрагмента Аβ42 или уменьшения количества Аβ40, либо увеличение количества обеих изоформ (Kuperstein 2010, Demuro et al., 2009). Нейрофибриллярные узелки образуются в цитоплазме нейронов и состоят из нерастворимых агрегатов гиперфосфорилированного белка tau. Накопление гиперфосфорилированного белка tau происходит как в сомато-дендритной области, так и в аксонах (Duyskaerts et al., 2009).

## **1.2. Гены, связанные с болезнью Альцгеймера.**

Большинство случаев БА являются спорадическими и характеризуются поздним проявлением симптомов - в возрасте от 60-65 лет. Близнецовый метод доказывает генетическую причину формы болезни Альцгеймера с поздним

проявлением симптомов (Bekris et al., 2010). Единственный ген, чья связь со спорадической формой БА была доказана, – это ApoE (аполипопротеин E) (Roses 2006, Coon 2007). Однако, даже носители аллели ApoE $\epsilon$ 4, преобладающей у пациентов с БА в 40% случаев и увеличивающей риск заболевания в 12 раз, могут дожить до 90 лет без каких-либо признаков заболевания (Laws et al., 2003; Bekris et al., 2010; Michaelson 2014). Это дает основания предполагать, что дополнительным фактором служат либо внешние условия, либо другие гены. На данный момент рассматриваются более 20-ти генов как возможные факторы риска развития спорадической формы БА (Chouraki et al., 2014; Van Cauwenberghe et al., 2016) Полный список исследуемых генов, предположительно связанных с БА, можно посмотреть на сайте <http://www.alzgene.org>

#### 1.2.1. Белок предшественник амилоида (APP).

Ген APP, локализованный на 21 хромосоме, был определен как генетическая причина БА благодаря тому факту, что у людей с синдромом Дауна, достигших возраста около 40 лет, присутствуют амилоидные образования в мозге (Giaccone et al., 1989). Ген APP кодирует белок предшественник амилоида. Существует несколько изоформ белка APP, образующихся за счет альтернативного сплайсинга, которые отличаются друг от друга по длине аминокислотной последовательности и по распределению в тканях организма. В центральной нервной системе преимущественно экспрессируется APP695, изоформы APP751 и APP770 экспрессируются и в центральной, и в периферической нервных системах (Golde 1990; Yoshikai 1990).

Мутации в гене APP составляют 15% случаев НБА с ранним проявлением симптомов в возрасте от 40 до 50 лет. (Janssen 2003; Raux 2005) Было идентифицировано около 43-х мутаций в гене белка предшественника амилоида, связанных с НБА и локализованных преимущественно в сайте ферментативного разрезания секретазы. (На базе

<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/> собраны все описанные мутации в гене APP (Cruts et al., 2012)).

Расщепление белка APP  $\alpha$ -секретазой (изоформы ADAM-9, ADAM-10, ADAM-17) приводит к образованию C-терминального фрагмента C83 ( $\alpha$ -CTF), альтернативное разрезание  $\beta$ -секретазой (изоформы BACE1, BACE2) приводит к образованию фрагмента C99 ( $\beta$ -CTF). Процессинг C83 и C99 фрагментов завершает  $\gamma$ -секретаза с образованием фрагментов р3 и A $\beta$  соответственно. Путь разрезания  $\beta$ -секретазой называется амилоидогенным, в то время как путь разрезания  $\alpha$ -секретазой называют неамилоидогенным (Рис.1). В зависимости от точки разрезания  $\gamma$ -секретазой из фрагмента C99 образуется либо 40 аминокислотный (A $\beta$ 40), либо 42 аминокислотный (A $\beta$ 42) экстраклеточный фрагмент A $\beta$ . В случае БА равновесие между данными формами смещено в сторону 42 аминокислотного остатка, более склонного к олигомеризации и формированию бляшек. Многие мутации в гене APP или фармакологическое ингибирование  $\alpha$ -секретазы приводят к преобладанию  $\beta$ -секретазного пути процессинга над  $\alpha$ -секретазным путем процессинга APP и повышенному образованию A $\beta$  (Nunan et al., 2000; Lichtenthaler et al., 2011). Наиболее токсичными считаются растворимые олигомеры A $\beta$ , состоящие из 4-24 пептидов (Demuro et al., 2009). Нерастворимая форма амилоидных образований рассматривается некоторыми исследователями как способ утилизации и деактивации токсичных растворимых форм A $\beta$  (Demuro et al., 2009).

Недавно в добавок к известным  $\alpha$ - и  $\beta$ -CTF был обнаружен еще один тяжелый C-терминальный фрагмент APP (CTF- $\eta$ ). Этот терминальный фрагмент получается в результате разрезания APP ферментом MT5-MMP, связанным с мембраной матриксной металлопротеазой, названной  $\eta$ -секретазой. Данная секретазы ко-локализуется с сенильными бляшками при БА. Разрезание этим ферментом реализуется в растворимом фрагменте sAPP- $\eta$ , который далее разрезается ADAM10 или BACE1, в результате чего получают длинный и короткий пептиды A $\eta$ - $\alpha$  и A $\eta$ - $\beta$ . Активность  $\eta$ -

секретазы усилено в дистрофических нейритах мышей, моделирующих БА, и тканях головного мозга пациентов с БА. Генетическое и фармакологическое ингибирование BACE1 приводит к слабому аккумулярованию STF- $\eta$  и A $\eta$ - $\alpha$ . Интересно, что A $\eta$ - $\alpha$  снижает долговременную потенциацию в гиппокампе также, как токсические олигомеры A $\beta$ , воздействующие на синапсы. На данный момент роль  $\eta$ -секретазы в БА еще мало изучена и требует дальнейших исследований, однако, эта находка может послужить хорошим началом для разработки новых терапевтических подходов (Willem et al., 2015).

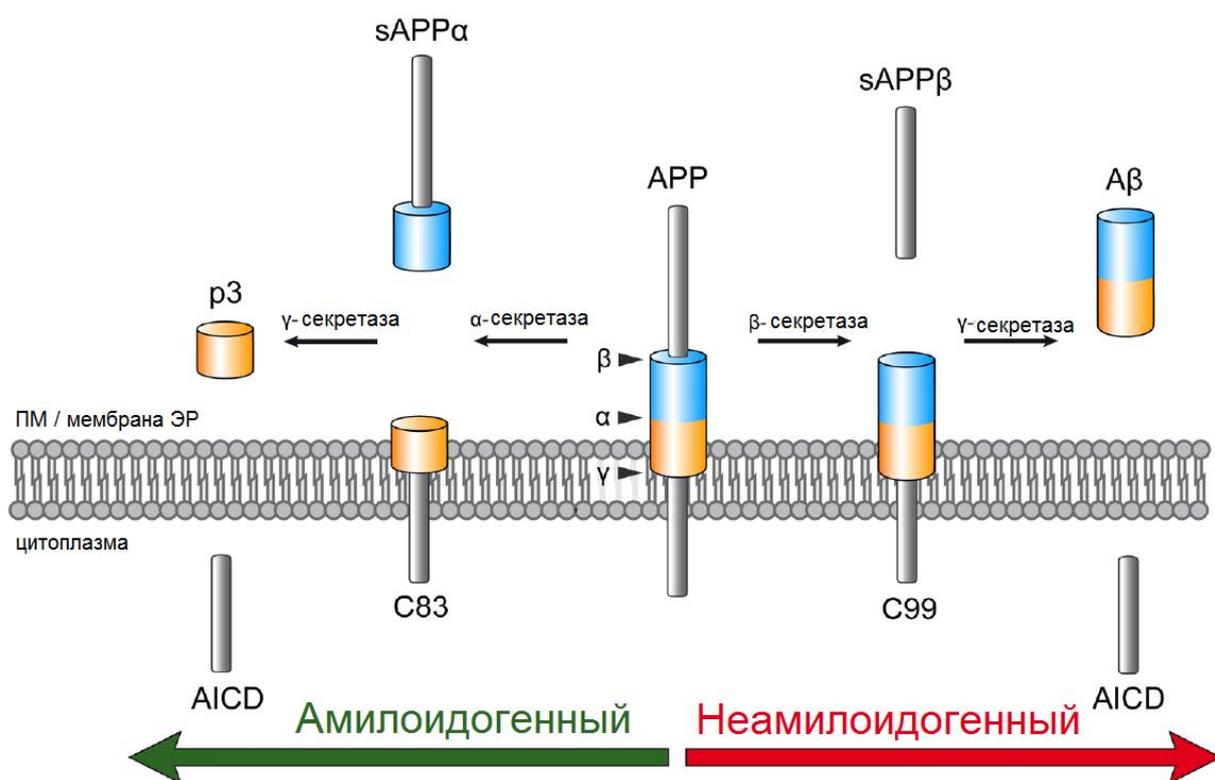


Рисунок 1. Амилоидогенный и неамилоидогенный пути разрезания белка APP (Vardy et al., 2005; с изменениями). Объяснение в тексте.

### 1.2.2. Пресенилины (PS) и гамма-секретаза.

Белки пресенилины известны как основные компоненты протеазного комплекса  $\gamma$ -секретазы, осуществляющей разрезание белка APP. Мутации в гене белка пресенилин-1 (*PSEN1*) относятся к 40% случаев аутосомно-доминантного наследования БА с ранним началом проявления симптомов в возрасте от 40 лет, и только 1% случаев приходится на мутации в гене белка

пресенилин-2 (*PSEN2*) (Bekris et al., 2010). Более 199 разных мутаций, связанных с наследственной БА (НБА), известно в гене белка пресенилин-1 и 20 мутаций в гене белка пресенилин-2. Мутации собраны в базе <http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations/> (Cruts et al., 2012).

Ген *PSEN1* локализован на 14 хромосоме и кодирует трансмембранный белок пресенилин-1 (PS1), состоящий из 467 аминокислот. Его гомолог *PSEN2* локализован на 1 хромосоме и кодирует белок пресенилин-2 (PS2), состоящий из 448 аминокислот. Белки PS1 и PS2 экспрессируются преимущественно в тканях головного мозга. Они имеют массу около 50 kDa, состоят из 9 трансмембранных доменов и локализованы в мембранах аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикулума (ЭР), эндосомах, лизосомах и клеточной мембране (Bekris et al., 2010; Sannerud et al., 2016).

В процессе созревания пресенилины проходят аутокаталитическое разрезание с образованием С-концевого (CTF) и N-концевого (NTF) фрагментов массой 18 kDa и 28 kDa для PS1 и 23 kDa и 35 kDa для PS2 соответственно. В комплексе с белками никастрин (Nct), Aph-1 (anterior pharynx defective 1), Pen-2 (presenilin enhancer 2) оба фрагмента пресенилинов входят в состав  $\gamma$ -секретазного комплекса. Оба CTF и NTF формируют каталитический центр комплексного фермента, осуществляя ферментативное разрезание за счет двух аспартатов (Wolfe et al., 1999; Fukumori et al., 2010). Роль других компонентов комплекса мало изучена. Предполагается, что Aph-1 является скэффолд-белком, обеспечивающим последовательное добавление других компонентов для образования комплекса (LaVoie et al., 2003; Niimura et al., 2005). Также предполагается, что белок Aph-1 участвует в распознавании субстратов (Chen et al., 2010). Никастрин, возможно, также играет роль в связывании с субстратом (Shah et al., 2005). Эктодомен никастрина гомологичен аминопептидазам, но не содержит аминокислот нужных для катализа, таким образом, он может связывать субстрат, но не разрезать его. Pen-2 связывается с пресенилинами (Fraering et al., 2004; Kim et al., 2005; Watanabe et al., 2005) и, как предполагается, стабилизирует пресенилины для

осуществления эндопротеолиза необходимого для формирования зрелого комплекса (Takasugi et al., 2003; Holmes et al., 2014). Несмотря на комплексную природу устройства фермента  $\gamma$ -секретазы, все известные ингибиторы и модуляторы этого фермента воздействуют через связывание с разными сайтами пресенилинов (Wolfe, 2011). Более того, не известно ни одной мутации в других компонентах фермента, кроме пресенилинов, которые были бы связаны с НБА (Zahs et al., 2015). Таким образом в патогенезе БА играет роль не столько фермент  $\gamma$ -секретаза, сколько сами пресенилины.

$\Gamma$ -секретаза осуществляет ферментативное разрезание многих трансмембранных белков, в том числе APP, Notch, белков E- и N-cadherin, neuregulin внутри их трансмембранного домена (Georgakopoulos et al. 1999; Marambaud et al. 2003; Wiley et al., 2005; Dejaegere et al. 2008).

Дефекты в гене PSEN1 вызывают наиболее серьезные формы БА, с началом заболевания уже в возрасте до или около 30-ти лет. В тоже время существует большая вариабельность в возрасте начала заболевания в зависимости от разных мутаций. В среднем возраст начала заболевания составляет 58 лет. Для БА, ассоциированной с мутациями в PSEN1, характерны аутосомно-доминантный тип наследования, прогрессивная деменция и паркинсонизм, нарушения Notch сигнализации и усиленное производство амилоидных образований в мозгу (Goedert et al., 2006; Wolfe, 2007).

Мыши с нокаутом гена белка PS1 нежизнеспособны (*PSEN1*<sup>-/-</sup>). Мыши с условным двойным нокаутом гена в переднем мозге в постнатальном периоде жизнеспособны, но демонстрируют нарушения когнитивных способностей – запоминания и ориентации в пространстве. (Shen et al., 1997; Yu et al., 2001) В нейронах таких мышей были обнаружены нарушения процесса выброса нейромедиаторов, долгосрочной потенциации и регуляции экспрессии генов (Watanabe et al., 2009, Zhang et al., 2009, Zhang et al., 2010). Мыши *PSEN2*<sup>-/-</sup> практически не отличаются от мышей дикого типа. По всей видимости, белок PS1 более важен для нормального развития и функционирования нервной системы, чем белок PS2, что может объяснять преобладающее количество

мутаций в гене белка PS1 связанных с БА (Elder et al., 2010). Мутации в генах *PSEN1* и *PSEN2* приводят к увеличению продукции A $\beta$ 42 и изменению соотношения A $\beta$ 42:A $\beta$ 40 в пользу A $\beta$ 42 (Kuperstein et al., 2010; Bentahir et al., 2006; Page et al., 2008).

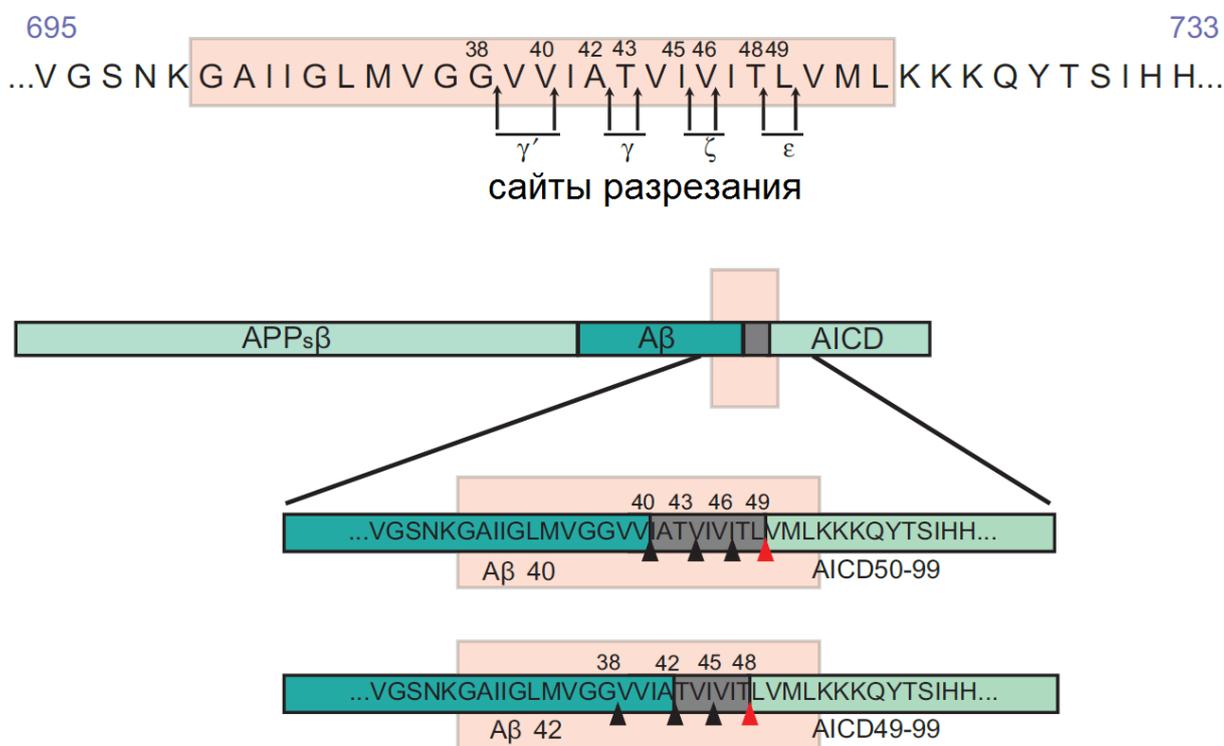


Рисунок 2. Сайты разрезания белка APP комплексом  $\gamma$ -секретазы. Объяснения в тексте.

Разрезание субстратов  $\gamma$ -секретазным комплексом проходит как минимум по двум позициям: по  $\gamma$ -сайту с продукцией C-терминального фрагмента A $\beta$  и по  $\epsilon$ -сайту далее по последовательности с продукцией внутриклеточного N-терминального фрагмента APP (AICD) (Weidemann et al., 2002). Разрезание фрагмента C99 по  $\gamma$ -сайту гетерогенно и приводит к получению пептидов A $\beta$  длиной 39 – 43 аминокислот. В то же время разрезание по  $\epsilon$ -сайту приводит к образованию преимущественно AICD, который начинается в основном у 50-ой аминокислоты, формируя AICD50-99, и иногда к образованию AICD51-99 с разрезанием на одну аминокислоту ранее. Мутации в пресенилинах и APP также приводят к увеличению AICD51-99 относительно AICD50-99. Следовательно, разрезание по этим сайтам не происходит независимо (Sato et

al., 2003). По всей видимости,  $\epsilon$ -разрезание с образованием длинного пептида A $\beta$ 49 проходит раньше  $\gamma$ -разрезания.  $\epsilon$ -разрезание может проходить без  $\gamma$ -разрезания, но не наоборот (Sato et al., 2005). Было предложено, что после  $\epsilon$ -разрезания и образования AICD, длинные пептиды (A $\beta$ 49 или A $\beta$ 48) остаются в активном сайте фермента и разрезаются выше на 3 или 4 аминокислотных остатка по так называемым  $\zeta$ -сайту и  $\gamma$ -сайту с образованием A $\beta$ 46, A $\beta$ 43 и A $\beta$ 40 из A $\beta$ 49 или A $\beta$ 45, A $\beta$ 42 из A $\beta$ 48, которые были найдены с помощью масс-спектрометрии (Qi -Takahara et al., 2005; Takami et al., 2009; Wolfe, 2012).

С помощью компьютерного анализа было установлено, что около 75% мутаций в гене *PSEN1* локализуются в наиболее консервативных участках и, вероятнее всего, приводят к потере или нарушению ферментативной функции  $\gamma$ -секретазы (Kim and Kim, 2008). Было предположено, что не все мутации затрагивают эндопротеолитическое или  $\epsilon$ -разрезание, но вероятнее всего почти все затрагивают протеолиз длинных пептидов A $\beta$ 48 и A $\beta$ 49 за счет карбоксипептидазной активности, что может приводить к образованию более длинных изоформ A $\beta$  (Wolfe, 2012). Тем не менее, как минимум две мутации в гене *PSEN1* с потерей ферментативной активности, связанные с НБА, приводили к нейродегенерации и нарушениям синаптической передачи у мышей. Обе L435F и C410Y мутации приводили к накоплению полноразмерного белка PS1 и дефициту его терминальных фрагментов, а также потере протеолитической активности в отношении субстратов APP и Notch (Xia et al., 2015).

Было обнаружено, что ферментативная функция PS1 в нейронах зависит от спайковой активности нейронов за счет влияния на конформацию PS1: единичные спайки не имели влияния на конформацию и продукцию A $\beta$ , в то время как пачка спайков меняла конформацию PS1 и оказывала влияние на соотношение A $\beta$ 40:A $\beta$ 42 в сторону увеличения производства A $\beta$ 40. К изменению конформации PS1 приводили ингибирование синаптической передачи на уровне пре-синапса *in vitro* и визуальная депривация *in vivo*.

Таким образом, существует связь между активностью нейронов и изменением соотношения A $\beta$ 40:A $\beta$ 42, которая может лежать в основе процессов, происходящих в случае спорадической формы БА (Dolev et al., 2013). «Патогенная» конформация PS1 была обнаружена в нейронах трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный APP, и в мозге пациентов со спорадической БА. Более того, у мышей преобладание данной конформации предшествовало появлению амилоидных отложений в мозге, развивающихся с возрастом. Также окислительный стресс способствовал переходу PS1 в патогенную конформацию в нейронах *in vitro* (Wahlster et al., 2013).

В тканях головного мозга пациентов с НБА было обнаружено накопление полноразмерного белка PS1, происходящего, по всей вероятности, за счет снижения степени аутокаталитического разрезания в результате мутации (Honarnejad et al. 2013). Увеличение уровня экспрессии белка PS1 также наблюдается в мозге пациентов со спорадической формой БА (Borghini et al., 2010). Транскрипция mRNA PS1 контролируется сигнальным каскадом киназы JNK (Rahman et al., 2012). ЭР стресс и убиквитинилирование регулируют количество PS1, не прошедшего аутокаталитическое разрезание (Jin et al., 2010; Yan et al., 2013). NGF и цинк тоже могут вызывать повышенный уровень PS1 в клетках (Counts et al., 2001; Park et al., 2001).

### 1.2.3. Другие гены, связанные с болезнью Альцгеймера.

Полногеномный поиск ассоциаций (GWAS, Genome-Wide Association Studies) продемонстрировал связь полиморфизмов в более чем 20 локусах с риском развития БА (Рисунок 3). Для того, чтобы найти редкие мутации, связанные с БА интенсивно используются новые технологии секвенирования генома (Zhang et al., 2013; Cruchaga et al., 2014). Найденные гены риска вовлечены преимущественно в регуляцию нескольких ключевых процессов: иммунная система и воспалительный процесс, метаболизм холестерина и липидов, утилизация эндосом (Guerreiro et al., 2014). Полиморфизмы этих генов могут быть часты в популяции, но имеют малый вклад в

индивидуальный риск развития БА. По всей вероятности, необходимо сочетание факторов среды, возраста и нескольких полиморфизмов для того, чтобы значительно повысить риск БА (Scheltens et al., 2016). Аллель *APOE4* является самым сильным рисковым фактором для развития БА: 50% для гомозигот и 20-30% для *APOE3/APOE4* гетерозигот (Genin et al., 2011). *APOE4* участвует в очистке мозга от Аβ и способен образовывать нейротоксичные фрагменты (Castellano et al., 2011; Mahley et al., 2012). У мышей с экспрессией *APOE4* человека наблюдается дегенерация кровеносных сосудов, нарушение работы гематоэнцефалического барьера и нейродегенерация, не зависящая от Аβ (Bell et al., 2012). Ген Кластерина (Clusterin, *CLU*) был первым обнаруженным геном риска для развития БА двумя независимыми исследованиями с полногеномным поиском ассоциаций. Кластерин является плеiotропным шапероном и участвует в процессах регуляции липидного обмена, воспаления и очистки мозга от Аβ (Lambert et al., 2013; Harold et al., 2009). Также обнаруженными генами риска являются *SORL1* и *ABCA7*, мутации в которых в том числе приводят к НБА. *SORL1* участвует в регуляции процессинга APP (Rogaeva et al., 2007; Hollingworth et al., 2011; Pottier et al., 2012; Lambert et al., 2013; Vardarajan et al., 2015). Мутации в *ABCA7* могут приводить к аутосомно-доминантному пути наследования НБА. *ABCA7* участвует в регуляции липидного метаболизма, иммунного ответа и очистки мозга от агрегатов Аβ (Cuypers et al., 2015; Steinberg et al., 2015). Продукт гена *BIN1* вовлечен в клатрин-регулируемый эндоцитоз в нейронах (Harold et al., 2009; Seshadri et al., 2010). Уровень экспрессии *BIN1* ассоциирован с более поздним началом заболевания и тяжелым протеканием заболевания, вероятно, за счет регуляции фосфорилирования tau (Karch et al., 2012; Charpuis et al., 2013). Продукт гена риска *CRI* имеет различные функции, включая регуляцию активации комплемента и регуляцию врожденного иммунитета. Также этот ген экспрессируется в нейронах, где его функция еще не изучена (Brouwers et al., 2012; Nazrati et al., 2012). Белок CD33 расположен на поверхности иммунных клеток, миелоидных клеток и микроглии, регулирует

межклеточные взаимодействия в процессах врожденного и приобретенного иммунитета (Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011). Микроглиальные клетки с экспрессией CD33 демонстрируют нарушения фагоцитоза Aβ и коррелирует с образованием амилоидных бляшек (Karch et al., 2012; Griciuc et al., 2013). Ген Фосфолипазы D3 (Phospholipase D3, PLD3) также ассоциирован с повышенным риском БА (Stuchaga et al., 2014). Недавно была подтверждена связь мутаций в гене *TREM2*: рецепторе микроглии, вовлеченном в очистку мозга от Aβ. Эти мутации крайне редки в популяции, но значительно повышают риск заболевания (Guerreiro et al., 2013). Подробнее гены риска рассмотрены в обзорах Van Cauwenberghe et al., 2016 и Scheltens et al., 2016.

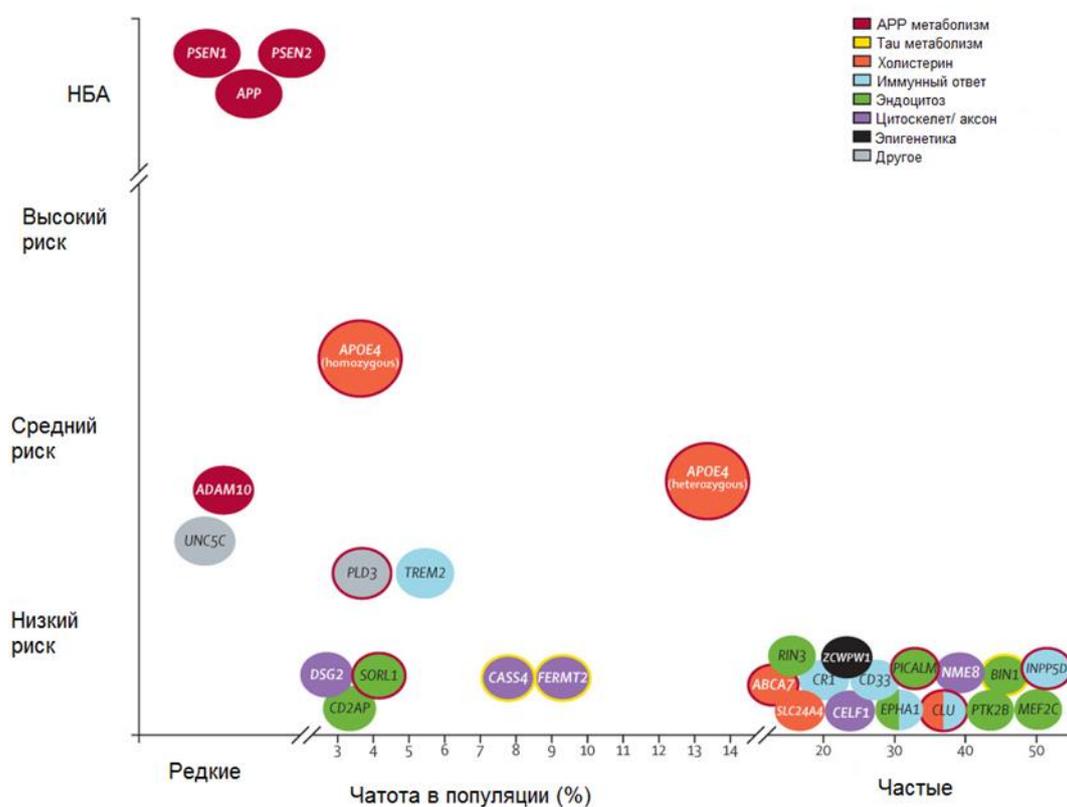


Рисунок 3. Схема описывающая генетические риски развития БА. Цветами на графике обозначены процессы, в которые вовлечены гены. Если ген имеет два или три цвета, то он вовлечен сразу в несколько процессов (Karch et al., 2015 с изменениями).

У пациентов с БА не происходит экспрессии гена *REST*, который участвует в процессах поддержания выживаемости клеток и в норме экспрессируется в

больших количествах в пожилом возрасте (Lu et al., 2014). Взаимодействие других генов и некодирующих микроРНК также может быть вовлечено в развитие БА (Lau et al., 2013; Wong et al., 2013).

Мутация R406W в гене *MAPT* неоднократно проявлялась в родословных с БА (Rademakers et al., 2003). Тем не менее, этот ген не является ключевым в наследовании НБА. Мутации в гене *MAPT* связаны с другими нейродегенеративными заболеваниями, такими как Ограниченная атрофия мозга, включающая болезнь Пика и другие деменции (FTD, Frontotemporal Dementia). Продуктом этого гена является белок tau (352-441 аминокислот), который в основном экспрессируется в нейронах, но в небольших количествах также встречается в глиальных клетках и клетках других тканей. Известно 6 изоформ белка tau, образующихся в результате альтернативного сплайсинга, 5 из которых экспрессируются в ЦНС. Изоформы отличаются по количеству повторов консервативного тубулин-связывающего мотива: три повтора (3R) или четыре повтора (4R). Также изоформы отличаются вставками аминокислот в N-терминальном участке белка (29 аминокислот - N1, 59 - N2 и 0 аминокислот N0) в сочетании как с 3R так и с 4R (Goedert et al., 1989; Goedert et al., 1989; Šimić et al., 2016). Самой важной функцией белка tau является регуляция собирания микротрубочек (Wischik et al., 1985; Crowther et al., 1991), но такой же функцией обладают и другие MAP белки. *MAPT* нокаутные мыши относительно нормальны и мало чем отличаются от мышей дикого типа. У них не было обнаружено признаков нейродегенерации, что, по всей видимости, связано с компенсацией другими белками, относящимися к группе MAP (Qiang et al., 2006). Tau также вовлечен в регуляцию синаптической передачи киназой Fyn (Lee et al., 2004; Roberson et al., 2011). Влияние на сбор микротрубочек зависит от степени фосфорилирования tau, и гиперфосфорилирование подавляет сбор микротрубочек (Lindwall et al., 1984; Alonso et al., 1994). В образцах, полученных у пациентов с БА, было обнаружено более 40 сайтов фосфорилирования белка tau (Hanger et al., 1998). Образование нейрофибриллярных узелков, состоящих из агрегатов

гиперфосфорилированного белка tau, является одним из ключевых признаков БА. Фосфорелирование tau регулируется активностью нескольких киназ и фосфотаз. При БА Ser/Thr участки за которыми следует аминокислота Pro составляют около половины всех фосфорилированных аминокислотных остатков. Их фосфорилирование осуществляется пролин-направляемыми протеиновыми киназами (proline-directed protein kinases, PDPK): киназой гликоген синтазы 3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ ), циклин-зависимой киназой 5 (cyclin-dependent kinase-5, CDK5) и дуально-специфичной регулируемой тирозиновым фосфорилированием киназой A1 (dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A, DYRK1A) (Ishiguro et al., 1992; Arioka et al., 1993; Woods et al., 2001; Liu et al., 2008). Другие Ser/Thr остатки фосфорилируются не-пролин-направляемыми протеиновыми киназами (non-PDPK): кальций/кальмодулин-активируемой киназой II (calcium/calmodulin-activated protein kinase II, CaMKII), регулирующей ассоциацию микротрубочек киназой 110 (microtubule affinity-regulated kinase 110, MARK p110), протеин киназой A (protein kinase A, PKA) и казеин киназой 1 (casein kinase 1, CK1) (Baudier et al., 1988; Ledesma et al., 1992; Singh et al., 1996; Singh et al., 1996; Drewes et al., 1997; Sironi et al., 1998). Фосфорилирование tau некоторыми из этих киназ приводит к дальнейшему фосфорилированию другими киназами (Singh et al., 1996; Singh et al., 1995; Singh et al., 1995; Sengupta et al., 1998; Sengupta et al., 1997; Liu et al., 2006). Множественные комбинации non-PDPK и PDPK вовлечены в патологическое гиперфосфорилирование при БА, и локализованы в нейрофибриллярных узелках (Pei et al., 1998; Pei et al., 1999; Pei et al., 2001). Главным регулятором дефосфорилирования tau является фосфотаза PP2A, которая отвечает за примерно 70% всех реакций дефосфорилирования в мозге. (Gong et al., 2000; Venncib et al., 2000; Liu et al., 2005). При БА взаимодействие гиперфосфорилированного белка tau в составе нефибриллярных олигомеров с нормальным белком tau приводит к цепному формированию филаментов и передаче патологии от клетки к клетке. Такого рода реакции характерны для прионов. По всей вероятности, это происходит

за счет эндоцитоза олигомеров нейронами вблизи к поврежденным нейронам, а также в процессах синаптической передачи (Alonso et al., 1994; Alonso et al., 1996; Clavaguera et al., 2009; Takeda et al., 2015; Sanders et al., 2014; Khan et al., 2014; de Calignon et al., 2012; Liu et al., 2012). Вторичность возникновения нейрофибриллярных узелков и tau-опосредуемая реализация цитотоксичности были подтверждены в исследованиях, в которых использование иммунизации против А $\beta$  снижало уровень образования нейрофибриллярных узелков, а также в исследованиях с использованием tau<sup>-/-</sup> мышей, продемонстрировавших сниженное токсическое влияние А $\beta$  на нейроны в условиях отсутствия экспрессии гена белка tau. Возможно, что влияние гиперфосфорилированного tau на чувствительность NMDAR к А $\beta$  опосредовано киназой Fyn (Ittner 2010). Таким образом, взаимное влияние белка tau и А $\beta$  можно описать как своеобразное цитотоксическое “pas de deux” (Ittner and Götz, 2011).

### 1.3. Модели болезни Альцгеймера *in vivo*.

Для исследования болезни Альцгеймера широко применяются модели *in vivo*, на основе различных животных. Для моделирования заболевания могут быть использованы как спонтанное или индуцированное развитие нейродегенерации, так и генетическая модификация животных. Для нескольких видов животных, включая собак (Cummings et al., 1993; 1996; Rofina et al., 2006), кошек (Head et al., 2005; Gunn-Moore et al., 2006), медведей (Cork et al., 1988; Uchida et al., 1995; Tekirian et al., 1996), козлов и овец (Braak et al., 1994), росомаху (Roertgen et al., 1996), также как для некоторых видов приматов (Bons et al., 1994; Gearing et al., 1994; 1997; Lane, 2000; Geula et al., 2002; Kimura et al., 2003; Sani et al., 2003; Lemere et al., 2004; 2008) было показано спонтанное развитие бляшек и/или нейрофибриллярных узелков. В некоторых случаях такого рода гистологические изменения сопровождаются снижением когнитивных способностей (Cummings et al., 1996; Voytko and Tinkler, 2004; Gunn-Moore et al., 2006; Rofina et al., 2006). Однако, использование данных животных для исследований ограничено их

доступностью, финансовыми и этическими причинами. В тоже время, удобные для лабораторных исследований грызуны (мыши, крысы и хомячки) не развивают типичные признаки БА с возрастом. Для исследования ряда возрастных патологических изменений в мозге, наблюдаемых и при БА, используются линии мышей с ускоренным старением. Линии SAM (мыши с ускоренным старением, senescence-accelerated mouse) были получены путем селекции по фенотипу мышей линии AKR/J в 80е годы XX века (Van Dam et al., 2011). Под-линия SAMP8 используется в качестве модели БА, так как развивает поведенческие симптомы и имеет отложения A $\beta$  в мозге (Yagi et al., 1988; Takeda, 1999). Также для активации развития нейродегенерации у мышей используются химические, фармакологические методы или физические повреждения мозга (Van Dam et al., 2011). В основном эти модели связаны с изучением холинэргического дефицита, характерного для БА. Модель скополамин-индуцируемой амнезии (Scopolamine) широко используется для изучения холинэргической недостаточности. Однако в этой модели отсутствуют главные гистологические признаки БА и прогрессия заболевания. Локальное уничтожение холинэргических нейронов путем применения токсичных веществ, электротока или механических повреждений в ядрах переднего мозга используется преимущественно для изучения нарушений работы нервных цепей в мозге. Эти методы считаются наиболее грубыми, так как могут включать также повреждения сосудов и глиальных клеток. Дефицит памяти, характерный для БА, может быть индуцирован также и повреждением ответственных за память регионов мозга: гиппокампа и коры мозга. Эти способы моделирования также имеют серьезные недостатки, так как модели не повторяют динамику развития заболевания и не имеют главных гистологических маркеров, и, в целом, могут быть использованы только для моделирования симптомов (Van Dam et al., 2011). Иные модели с индукцией патологии направлены на изучение других аспектов заболевания: например, воспаление или нарушение энергетического метаболизма. Воспаление может быть вызвано инъекциями эндотоксинов (липополисахарида) (Haus-

Wegrzyniak et al., 1998) или про-воспалительных цитокинов (Wenk et al., 2003). Нарушения метаболизма могут быть вызваны за счет вмешательства в функции митохондрий (Szabados et al., 2004) или в регуляцию инсулинового сигнального пути в нейронах (Ishrat et al., 2009).

Механизм патологического действия Аβ также изучается *in vivo* на животных. Для этого осуществляются инъекции Аβ в мозг грызунов. Такой метод имеет свои недостатки, так как в разных протоколах раствор пептидов может содержать различные состояния Аβ: свободных пептидов и олигомеров – в различных концентрациях и соотношениях. Подобные модели не демонстрируют полный фенотип БА. Более того, сам факт оперативного вмешательства может иметь последствия из-за повреждений в результате манипуляций с тканями мозга: от механических повреждений до воспаления (Van Dam et al., 2011). Сравнительно недавно было сделано исследование, демонстрирующее прионные свойства Аβ при инъекции растворимых форм пептида, взятых из экстрактов мозга трансгенных мышей, в очень маленьких концентрациях (Morales et al., 2015). Данное исследование открывает новые перспективы для моделирования патологии, связанной с Аβ.

С появлением и развитием техник, позволяющих осуществлять перенос генов и редактировать геном, открылась эра моделирования БА с помощью трансгенных или генетически модифицированных животных. На данный момент были созданы различные модели на основе трансгенных свиней (Holm et al., 2016), мышей, крыс, *Danio rerio*, *Caenorhabditis elegans* и *Drosophila melanogaster* (Van Dam et al., 2011). Эти модели имеют свои плюсы и минусы в зависимости от используемого вида животных. Например, свободноживущая нематода *Caenorhabditis elegans* обладает коротким жизненным циклом (3 недели), недорога в содержании, имеет ортологи генов, вовлеченных в БА (ортологи генов *PSEN1/PSEN2*, *APP* и белков-компонентов γ-секретазы) (Li и Greenwald, 1997), но при этом не имеет ортолога *BACE1*, и ее ген-ортолог *APP* не содержит последовательности Аβ, а ее нервная система крайне примитивна для моделирования полного фенотипа БА человека. Тем не менее,

примитивное поведение в купе с секвенированным геномом и набором известных мутантов с характерными фенотипическими проявлениями делают возможным проведение генетических скринингов для изучения механизмов нейродегенеративных процессов. Рыбки *Danio rerio* также используются для исследования БА, так как существует большой набор инструментов для модификации их генома или экспрессии генов, они имеют ортологи генов *PSEN1/PSEN2*, *APP* и белков-компонентов  $\gamma$ -секретазы (Musa et al., 2001; Nornes et al., 2003), а также имеют короткий жизненный цикл и недороги в разведении. Эти рыбки удобны для исследований токсичности потенциальных лекарственных препаратов по причине легкого способа доставки препарата в нужной концентрации и чувствительности этих рыбок к токсинам, а также для генетических скринингов, так как существует большой набор животных с известными мутациями и геном секвенирован. Тем не менее, рыбки *Danio rerio* не могут быть использованы для моделирования полного фенотипа БА (Van Dam et al., 2011).

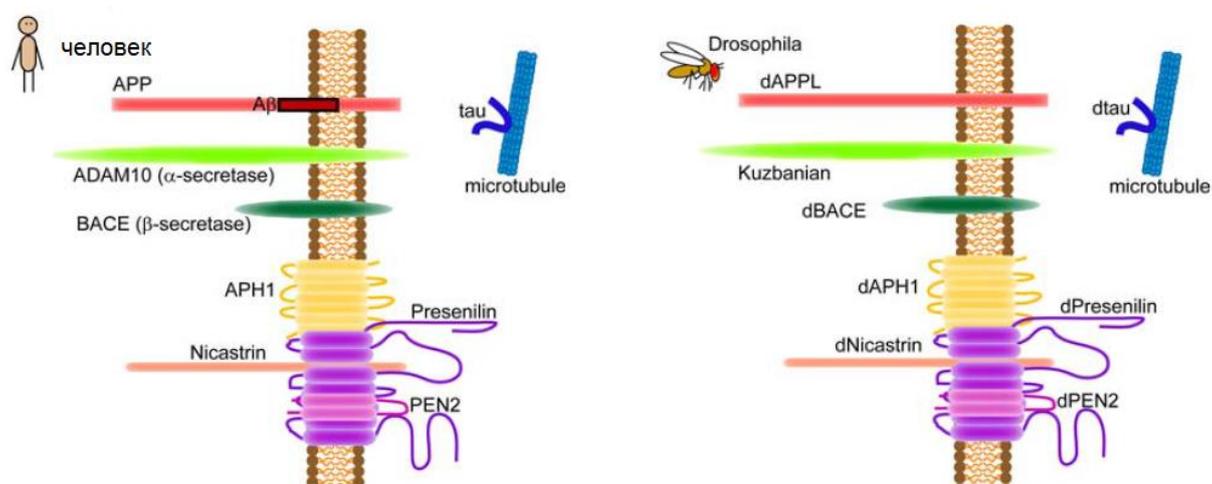


Рисунок 4. Схематическая иллюстрация белков, вовлеченных в патогенез БА и имеющих ортологи в геноме дрозофилы (Цитируется по Iijima-Ando et al., 2009 с изменениями).

*Drosophila melanogaster* широко используется для моделирования нейродегенеративных заболеваний. Геном дрозофилы секвенирован, существует набор известных мутаций с ярким фенотипическим проявлением, что позволяет осуществлять генетический скрининг и находить гены

ассоциированные в развитии патологии заболеваний. Для исследований нейродегенеративных процессов на дрозофиле возможно использование широкого спектра методов, включая электрофизиологические методы и поведенческие тесты. Дрозофилы обладают достаточно сложным поведением в той мере, чтобы изучать процессы нарушения памяти, проявления агрессии, механизмов сна и циркадных ритмов (Kamyshev et al., 1999; Alphen et al., 2013; Iijima-Ando et al., 2009). *Drosophila melanogaster* имеет ортологи генов, вовлеченных в патогенез БА: *PSEN1/PSEN2*, *APP*, белков-компонентов  $\gamma$ -секретазы,  $\beta$ -секретазы *BACE*,  $\alpha$ -секретазы и белка tau (Рисунок 4). *dAPPL* гомологичен человеческому *APP* на 30%, но в тоже время не имеет последовательности пептида  $A\beta$  (Luo et al. 1992). Кузбаниан (Kuzbanian, Kuz) является ортологом  $\alpha$ -секретазы *ADAM10* (Allinson et al. 2003; Rooke et al. 1996) и также режет *dAPPL* (Carmine-Simmen et al. 2009). *dBACE* гомологичен на 25% человеческому *BACE1* и на 28% человеческому *BACE2*. Однако, *dBACE* не режет человеческий *APP* по известному  $\beta$ -сайту и осуществляет разрезание в другой аминокислотной последовательности (Carmine-Simmen et al. 2009; Greeve et al. 2004). У дрозофилы также найдены гены-ортологи всех компонентов  $\gamma$ -секретазы, с белком *dPsn* идентичному человеческому *PS1* на 53% (Periz and Fortini 2004; Takasugi et al. 2003). Для дрозофил характерно сильное преобладание неамилоидогеного  $\alpha$ -разрезания *dAPPL*, вызванное слабой активностью *dBACE*. В связи с этим, чтобы получить трансгенных дрозофил с образованием амилоидных бляшек, понадобилось сделать вставки трех генов: *APP* и *BACE1* человека и гена дрозофилы, кодирующего *dPsn* с внесенными мутациями характерными для НБА. При этом, уровень образования  $A\beta$  и бляшек был очень низким, что привело исследователей к выводу, что единственным способом изучать патологию, связанную с  $A\beta$ , является создание трансгенных дрозофил с экспрессией  $A\beta$  человека. Таким образом, *Drosophila melanogaster* является хорошим объектом для исследования процессов, не связанных с образованием  $A\beta$  (Iijima-Ando et al., 2009). У дрозофил, моделирующих БА, также не было обнаружено

нейрофибриллярных узелков, что делает необходимым дополнительную экспрессию мутантных генов белка tau человека в целях воспроизводства полного фенотипа БА (Wittmann et al., 2001).

Трансгенные мыши широко используются для моделирования БА. Наиболее полную информацию о существующих трансгенных моделях можно посмотреть на <http://www.alzforum.org/research-models>. Первые модели, созданные в 90-е годы XX века, были использованы для изучения роли амилоидного каскада в нейродегенерации. Модель PDAPP имеет мутацию V717F/APPInd (Indiana) в гене белка APP человека (Games et al., 1995), модели Tg2576 (Hsiao et al., 1996) и APP23 (Stürchler-Pierrat et al., 1997) экспрессируют APP человека с мутацией K670N/M671L/APPSwe (Swedish). Все три модели демонстрируют прогрессивное образование амилоидных бляшек, церебральную амилоидную ангиопатию, астроцитоз, микроглиоз, частичную атрофию гиппокампа, нарушения в работе синапсов, когнитивные и поведенческие нарушения, характерные для БА человека (подробнее в Van Dam et al., 2005; Basak et al., 2010; Deacon, 2010; Van Dam et al., 2010). Данные модели подтверждают роль амилоидного каскада в развитии нейродегенеративных процессов у человека при БА и могут быть использованы для доклинических испытаний потенциальных лекарственных препаратов, направленных на регуляцию амилоидного каскада. Однако существенным недостатком этих моделей является отсутствие нейрофибриллярных узелков.

После открытия роли мутаций в генах *PSEN1* и *PSEN2* в развитии НБА были созданы соответствующие трансгенные модели. К сожалению, эти модели имели относительно слабый фенотип, несмотря на изменения в соотношении A $\beta$ 42:A $\beta$ 40. Это связано с тем, что в белке APP мыши отсутствуют 3 существенные аминокислоты, необходимые для олигомеризации (Elder et al., 2010; Van Dam et al., 2011). Линии этих мышей были затем использованы для создания дважды трансгенных мышей с дополнительной экспрессией APP человека с мутациями. Дважды трансгенные

мышь имели изменения в соотношении A $\beta$ 42:A $\beta$ 40, образование амилоидных бляшек, потерю нейронов, воспаление и симптомы деменции (McGowan et al., 2006; Van Dam and De Deyn, 2006). Тем не менее, у мышей также отсутствовали нейрофибриллярные узелки.

По всей видимости, белок tau мышей настолько отличается от человеческого структурно и в аминокислотной последовательности, что запуск амилоидного каскада не приводит к образованию нейрофибриллярных узелков (LaFerla et al., 2012). В связи с этим были созданы трижды трансгенные мыши (3  $\times$  Tg) с дополнительной экспрессией мутантного tau человека (Oddo et al., 2003). В подтверждение амилоидной гипотезы у таких мышей нейрофибриллярные узелки развиваются после амилоидных бляшек (Sy et al., 2010).

#### **1.4. Амилоидная гипотеза развития болезни Альцгеймера.**

В связи с открытием основных генов, вызывающих или повышающих риск БА, была сформулирована так называемая «амилоидная гипотеза». Эта гипотеза подразумевает центральную роль A $\beta$  в развитии патологии. На данный момент существуют данные как в поддержку, так и против этой гипотезы (Herrup 2015; Musiek et l., 2015; Karran et l., 2016). Ключевыми данными, поддерживающими эту гипотезу, являются:

1. Генетическая связь наследственной формы БА с мутациями в гене белка APP и генах пресенилинов, напрямую вовлечённых в производство A $\beta$  (Musiek et l., 2015; Karran et al., 2016).

2. Связь спорадической формы БА с генами, участвующими в очистке мозга от A $\beta$  (например, *APOE* и *PICALM*) (Genin et al., 2011).

3. Наличие амилоидных образований в мозге пациентов с БА и НБА (Musiek et l., 2015; Karran et al., 2016)

4. Обнаружение мутации A673T в гене APP, которая приводит к пониженному образованию A $\beta$  в мозге и значительно снижает риск БА по сравнению с риском в общей популяции (Jonsson et al., 2012).

5. Связь трисомии по 21-ой хромосоме (содержит ген *APP*) с нейродегенерацией и амилоидными образованиями (Glennner et al., 1984; Potter et al., 2016).

6. Связь  $A\beta$  и tau в опосредованной цитотоксичности (Ittner 2010; Ittner and Götz, 2011).

7. Прионоподобное поведение  $A\beta$  (Jaunmuktane et al., 2015; Walker et al., 2015; Ye et al., 2015; Frontzek et al., 2016).

Главными механизмами патогенеза БА согласно этой гипотезе являются прямое цитотоксическое действие  $A\beta$ , негативное влияние  $A\beta$  на синапс, распространение заболевания по тканям мозга подобно прионному заболеванию, при котором патогенные формы  $A\beta$  связываются с нормальными формами и изменяют их свойства, передаваясь от клетки к клетке через синаптические окончания (Musiek et al., 2015; Karran et al., 2016). Развитие патологии с возрастом связывают с пониженной очисткой мозга от различного «молекулярного и клеточного мусора», включая различные формы  $A\beta$ , за счет работы лимфатической системы мозга и глиальных клеток *per se* (Kress et al., 2014; Zhao et al., 2014; Xie et al., 2013). Какая форма  $A\beta$  играет наибольшую роль в патологии до сих пор не известно. Распространено мнение, находящее подтверждение в многочисленных данных, что наибольшим патогенным потенциалом обладают формы  $A\beta$ , образующие растворимые олигомеры, в то время как амилоидные бляшки являются инертной формой образований (Delacourte et al., 1999; Walsh et al., 2007). Существуют данные, которые демонстрируют наличие образования олигомеров, предшествующих развитию симптомов деменции задолго до образования амилоидных бляшек (McLean et al., 1999; Esparza et al., 2013) Для осуществления цитотоксичности, приводящей к гибели нейронов, скорее всего, необходимо взаимодействие tau и  $A\beta$  (Tiraboschi et al., 2004). Однако тот факт, что мутации в генах белка *APP* и пресенилинов приводят к образованию патологических форм tau, но не наоборот, говорит в пользу первичной роли  $A\beta$  (Musiek et al., 2015). Более того, первичная роль  $A\beta$  была подтверждена неоднократно в экспериментах на

клеточных культурах нейронов и нокаутных мышцах с использованием как искусственных олигомеров Аβ, так и полученных из мозга человека (Ferreira et al., 1997; Rapoport et al., 2002; Zempel et al., 2010; Jin et al., 2011). Более того, Аβ взаимодействует с другими амилоидными белками, вовлекая их в развитие патологии. Общей характеристикой амилоидных белков является наличие в структуре бета-листов, т.е. формы регулярной вторичной структуры белков, состоящей из бета-цепей, связанных с боков двумя или тремя водородными связями, образуя слегка закрученные, складчатые листы. Объединение множества бета-листов может приводить к образованию белковых агрегатов и фибрилл, наблюдаемых при амилоидозах (Luo et al., 2016). Такими белками, например, являются прионный белок (PrP), α-синуклиин (α-syn), tau и фибриноген (Masliah et al., 2001; Ahn et al., 2010; Ittner 2010; Ittner and Götz, 2011; Nicoll et al., 2013). Существует много данных, говорящих в пользу того, что прионный белок является специфическим рецептором для олигомеров Аβ (Lauren et al., 2009). Патологический эффект олигомеров Аβ на синаптическую функцию нейронов осуществляется за счет сигнального каскада, включающим PrP, metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5), киназу Fyn, синаптический белок Homer, а также eEF2, CamKII, and Pyk2 (Um et al., 2013; Um et al., 2012; Haas et al., 2016). Также на роль рецептора для олигомеров Аβ претендуют белки: Sigma-2/PGRMC1, LILRB2, RAGE и ряд других белков (Рисунок 5) (Kim et al., 2013; Izzo et al., 2014; Benilova et al., 2012; Deane et al., 2012).

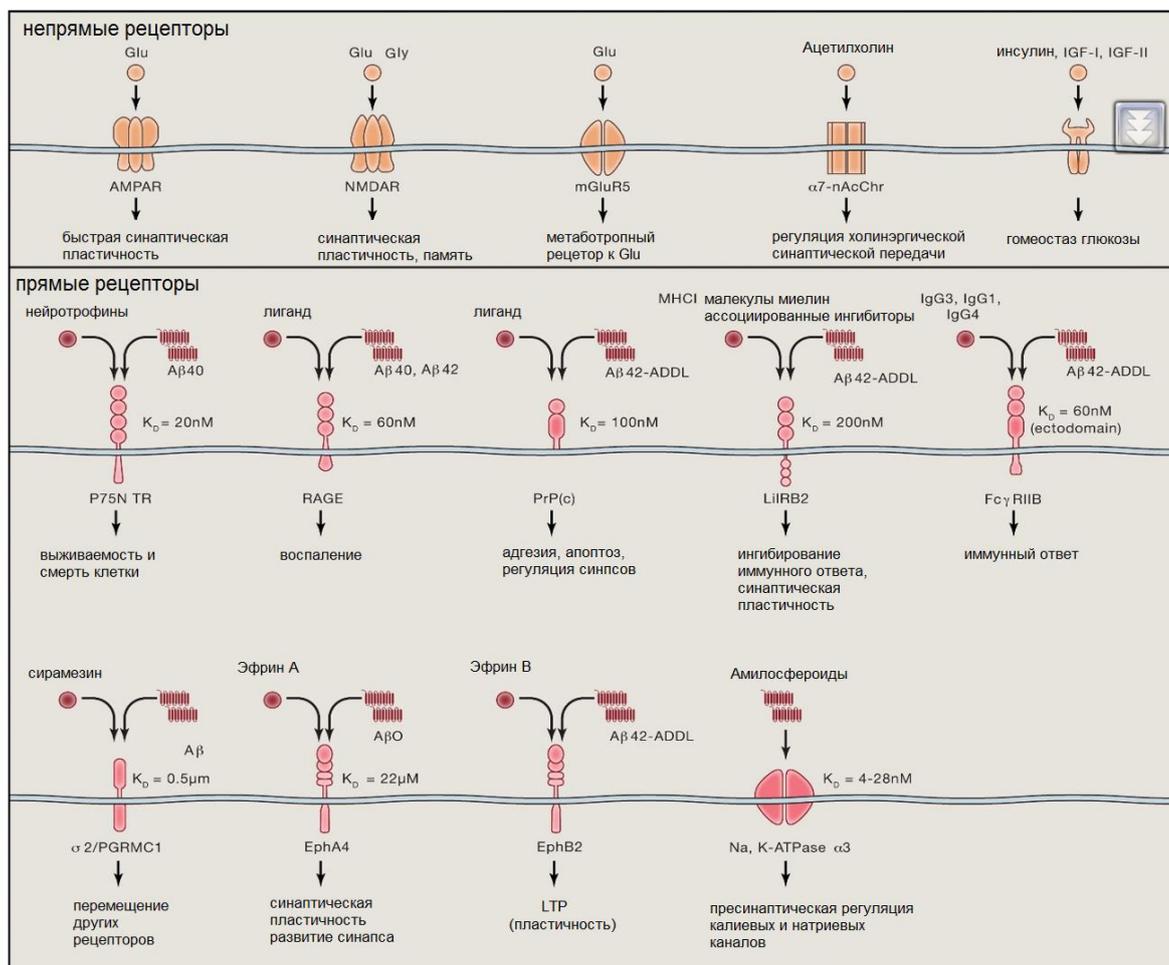


Рисунок 5. Рецепторы, вовлеченные в передачу патологического сигнала от олигомеров Aβ и их функции. Указана установленная K<sub>D</sub> для взаимодействия олигомеров и рецептора. (Цитируется по De Strooper et al., 2016 с изменениями).

Несмотря на обилие данных в пользу амилоидной гипотезы, существует немало данных, ставящих эту гипотезу под сомнение. Основными пунктами критики этой гипотезы являются:

1. Неизвестно ни одной мутации в генах β- или α-секретазы, связанных с БА.
2. Симптомы не всегда коррелируют с амилоидными образованиями в мозге (Villemagne et al., 2011; Klunk et al., 2009)
3. Необходимо достаточно долгое время для развития заболевания: могут пройти многие годы от момента образования амилоидных бляшек (Villemagne et al., 2013).

4. У мышей и других трансгенных животных, экспрессирующих только А $\beta$ , не выявляется других признаков заболевания кроме бляшек, а сами симптомы не сильно выражены. Более того, быстрое восстановление трансгенных животных при анти-амилоидной терапии могут быть связаны с недостаточно полным фенотипом заболевания (Kim et al., 2013).

5. Терапии, направленные на снижение количества А $\beta$  в мозге, приводят к стабильному понижению амилоидных образований, но не восстанавливают когнитивных способностей и не замедляют развитие заболевания (Holmes et al., 2008; Vellas et al., 2013).

Было предположено, однако, что люди, у которых есть бляшки, но еще нет симптомов, находятся в так называемом пре-клиническом состоянии БА (Sperling et al., 2011). Если образование бляшек является главным критерием диагностики, то такие люди могут быть включены в клинические испытания, несмотря на то, что они «здоровы». В тоже время, если есть люди, у которых нет бляшек, но есть другие симптомы БА, то, тем не менее, они могут быть исключены из клинических исследований. Это дополнительно может создавать проблемы для исследований новых препаратов и стратегий лечения.

Существуют другие гипотезы, объясняющие механизм БА. Существуют данные в пользу роли нарушения аутофагии и/или функции лизосом (Nixon et al., 2011; Nixon et al., 2006), в пользу роли нарушения кальциевого гомеостаза (Bezprozvanny et al., 2008; Demuro et al., 2010; Green et al., 2008; Khachaturian et al., 1987; Supnet et al., 2010; Szydlowska et al., 2010; Yu et al., 2009), нарушений клеточного цикла (Arendt et al., 2010; Voeras et al., 2008; Busser et al., 1998; Herrup et al., 2007; Kruman et al., 2004; McShea et al., 1997; Nagy et al., 1997; Vincent et al., 1996; Yang et al., 2001) и воспаления (Mosher et al., 2014; Cameron et al., 2010; Heneka et al., 2007; McGeer et al., 1996; Krstic et al., 2013). Также оксидативный стресс (Zhu et al., 2006), повреждение ДНК (Bucholtz et al., 2013; Canugovi et al., 2013; Coppedè et al., 2009; Cotman et al., 1996; et al., Herrup et al., 2013; Iourov et al., 2009; Lovell et al., 2007; Weissman et al., 2009), нарушения митохондриальных функций (Swerdlow et al., 2014; Swerdlow et al.,

2004; Yao et al., 2009), нарушенный метаболизм глюкозы (Ferreira et al., 2014; Cholerton et al., 2013) могут оказывать существенный вклад в развитие заболевания.

### **1.5. Наследственная болезнь Альцгеймера и спорадическая болезнь Альцгеймера.**

На данный момент известно 227 мутаций в гене *PSEN1*, из которых 204 (90%) напрямую связаны с НБА и 23 мутации не имеют патологического фенотипа или имеют неясный фенотип. Только 16 мутаций (42%) в гене *PSEN2* из 38 известных связаны с НБА, в то время как большинство либо не имеют явного патологического фенотипа, либо имеют иной патологический фенотип, такой как ограниченная атрофия мозга, включая болезнь Пика, болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви и другие деменции (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>, Cruts et al., 2012, <http://www.alzgene.org>). Исследования спорадической формы БА показало, что только около половины случаев деменции Альцгеймеровского типа можно отнести к чистой БА, неосложненной другими патологиями мозга, в то время как другая половина случаев характеризуется наличием сопутствующих деменций, таких как болезнь Паркинсона, деменция с тельцами Леви, васкулярная деменция, гиппокампальный склероз, болезнь Пика, ограниченная атрофия мозга и другие. Для сравнения, только 12 мутаций в гене *PSEN1* имеют сопровождающие заболевания мозга. НБА характеризуется более сильным образованием амилоидных бляшек и нейрофибриллярных узелков, при этом цереброваскулярные патологии, гиппокампальный склероз, TDP-43 протеинопатия практически отсутствует в сравнении со спорадической формой (Cairns et al., 2015). Наблюдаемая разница между формами заболевания может быть объяснена отличаеми в возрасте манифестации, которые приводят к тому, что у более молодых пациентов с НБА не наблюдается сопутствующих заболеваний. Несомненно, это ставит под вопрос знак равенства между двумя формами заболеваний. В дополнение к этому,

биохимические процессы, участвующие в патогенезе этих форм БА, тоже отличаются. Мутации в генах пресенилинов оказывают различное влияние на их ферментативную активность в отношении многочисленных субстратов. В связи с тем, что мутации могут быть расположены в аминокислотной последовательности в разных областях, эффекты, которые они производят на разрезание субстратов, часто отличаются. Таким образом, помимо влияния на образование амилоидных пептидов, мутации могут вызывать и другие нарушения клеточных функций. Для НБА также характерны более быстрое и раннее образование нейрофибриллярных узелков и гибель нейронов. В тканях мозга пациентов с НБА чаще обнаруживают образование так называемых “cottonwood” бляшек (по виду напоминающих тополиный пух), а также тельца Леви, тельца Пика, изменения в белом веществе и наличие разной степени микрогеморрагии (Armstrong, 2014; Gomez-Isla et al., 1999). Наблюдаемые различия в протекании болезни, клинической патологии и других параметрах ставят вопрос о правильности классификации форм БА, а также о правомерности экстраполяции данных. Некоторые исследователи считают необходимым рассматривать различные формы НБА как отдельные орфанные заболевания. Такой подход может помочь в поиске лечения за счет персонализации диагностики и терапии (Roher et al., 2016).

#### **1.6. Терапия болезни Альцгеймера.**

На данный момент все доступные лекарства на рынке направлены исключительно на снижение симптомов и не способны «вылечить» БА. Новые препараты, находящиеся в разработке, в основном направлены на регуляцию протекания заболевания, в том смысле, что эти препараты направлены на патологические процессы, ведущие к БА, с целью замедлить ее развитие (Galimberti et al., 2011).

Первые симптоматические препараты, разработанные для борьбы с БА – ингибиторы ацетилхолинэстеразы (AChEI) (Galimberti et al., 2011). Эти препараты были разработаны на основе холинэргической гипотезы БА,

которая утверждала, что холинэргический дефицит, в частности сниженный уровень ацетилхолина и потеря холинэргических нейронов в переднем мозге вовлечены в патологию БА (Lawrence et al., 1998). На данный момент существует 3 одобренных АСhEI на рынке для лечения средней и легкой формы БА Donepezil (Pfizer), Rivastigmine (Novartis) и Galantamine (Janssen). Разработка этих препаратов также продолжается. Кроме этого симптоматическим препаратом является Memantine (Merz, Forest и Lundbeck) для лечения от средней до тяжелой формы БА (Yiannopoulou et al., 2013). Memantine некокурентный агонист NMDA рецептора со средней аффинностью, который, считается, снижает эксайтотоксичность (Galimberti et al., 2011; Yiannopoulou et al., 2013).

На основе широко принятой амилоидной гипотезы БА большинство подходов для регуляции протекания заболевания сфокусированы на развитии препаратов, оказывающих влияние А $\beta$  (Yiannopoulou et al., 2013). Такие подходы предполагают, что увеличенное количество А $\beta$  в его разных формах, например, бляшки, растворимые олигомеры, фибриллы и протофибриллы, играют главную роль в патологии БА. Таким образом, если убрать нейротоксический А $\beta$ , то можно получить клинический эффект. Так как первым шагом в процессинге APP является разрезание  $\beta$ -секретазой, в качестве потенциальных лекарственных препаратов были разработаны несколько ингибиторов BACE1. Однако, оказалось, что ингибирование BACE1 – это довольно трудная задача по двум причинам: во-первых, BACE1 разрезает множество субстратов кроме APP, которые выполняют важные физиологические функции, и таким образом ингибирование фермента может быть токсичным; во-вторых, у BACE1 достаточно большой активный сайт, что делает ингибиторы достаточно большими, чтобы не проникать через гематоэнцефалический барьер (Galimberti et al., 2011; Yiannopoulou et al., 2013). В связи с такими трудностями только небольшое количество разработанных ингибиторов достигли клинических испытаний (Ghosh et al., 2012). Мультипротеинный комплекс  $\gamma$ -секретазы, в котором ферментативные

функции выполняют пресенилины (PS1 и PS2) ответственен за финальное разрезание APP с образованием A $\beta$ . Также, как и  $\beta$ -секретаза этот фермент разрезает много трансмембранных белков. Вследствие чего применение ингибиторов  $\gamma$ -секретазы показало большое количество побочных эффектов, связанных, как считается, с ингибированием разрезания сигнального белка Notch и нейротоксичного недорезанного терминального фрагмента APP (Tomita, 2009). Несмотря на то, что некоторые ингибиторы дошли до клинических испытаний, их поздние стадии были прерваны из-за токсичности и побочных эффектов, влияющих на сознание и самочувствие пациентов (Imbimbo et al., 2011).

Далее были разработаны более специфические ингибиторы  $\gamma$ -секретазы, затрагивающие разрезание только APP (Basi et al., 2010), а также модуляторы  $\gamma$ -секретазы (GSM) ингибирующие специфически продукцию амилоидогенного A $\beta$ 42 и увеличивая продукцию более коротких A $\beta$ , достигающих в длину менее 38 аминокислотных остатков, не затрагивая разрезание Notch (Weggen et al., 2001; Tomita, 2009; Mangialasche et al., 2010; Imbimbo et al., 2011). Некоторые нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), включая ibuprofen, indomethacin и sulindac sulfide, имеют активность GSM (Mangialasche et al., 2010; Galimberti et al., 2011; Yiannopoulou et al., 2013). Однако применение этих препаратов показало слабый эффект в клинических испытаниях и сопровождалось токсическим влиянием на печень. Более того более короткие формы A $\beta$  еще мало изучены и могут производить непредсказуемый эффект (Golde et al., 2013).

Кроме ингибирования продукции A $\beta$  возможным путем регуляции его производства является стимулирование неамилоидогенного разрезания APP через усиление активности  $\alpha$ -секретазы (Salomone et al., 2011; Chasseigneaux et al., 2012). Таким образом стимуляторы  $\alpha$ -секретазы стали еще одним направлением в разработке лекарственных средств, затрагивающих разрезание APP (Fahrenholz et al., 2006). Несмотря на то, что все клинические испытания показали отсутствие эффекта, результаты по безопасности

использования подобных препаратов предполагает дальнейшие разработки в этой области (Marcade et al., 2008; Galimberti et al., 2011).

Гипотеза о том, что к нарушению работы синапсов и гибели нейронов приводят олигомеры А $\beta$ , была использована для разработки лекарственных препаратов, направленных на предотвращение олигомеризации А $\beta$  (Mangialasche et al., 2010). Примерами таких препаратов являются гликозаминогликаны, которые связываются с мономерами А $\beta$  и предотвращают формирование олигомеров (Gauthier et al., 2009), хелаторы цинка и меди, которые растворяют амилоидные отложения (Adlard et al., 2008; Mangialasche et al., 2010; Galimberti et al., 2011) и сцилло-инозитолы, которые напрямую связываются с олигомерами А $\beta$  и запускают разобщение агрегатов. (Fenili et al., 2007; Salloway et al., 2011). Однако неясные результаты 3-ей фазы клинических испытаний этих препаратов говорят о необходимости более точной оценки их лекарственного потенциала (Mangialasche et al., 2010; Galimberti et al., 2011; Salomone et al., 2011; Salloway et al., 2011; Yiannopoulou et al., 2013).

Активная иммунизация (вакцинация) и пассивная иммунизация (моноклиальные антитела) рассматриваются как многообещающие подходы, нацеленные на усиление очистки тканей мозга от А $\beta$  и на снижение его продукции и агрегации (Town, 2009; Salomone et al., 2011). Активная иммунизация подразумевает стимуляцию иммунной системы с целью продукции антител против патогенных форм А $\beta$ , а пассивная иммунотерапия предполагает введение экзогенных моноклиальных антител (Town, 2009). Несмотря на то, что некоторые иммунотерапии показали неблагоприятные побочные эффекты (Check, 2002; Gilman et al., 2005; Morgan, 2010; Mangialasche et al., 2010), на данный момент несколько антител проходят клинические испытания для лечения БА (Brody et al., 2008; Mangialasche et al., 2010; Galimberti et al., 2011; Yiannopoulou et al., 2013).

На основе гипотезы о том, что патология, связанная с tau белком, играет одну из центральных ролей в развитии БА и сильно коррелирует со стадиями

этого заболевания, были разработаны терапевтические подходы, направленные на tau белок (Mudher et al., 2001; Iqbal et al., 2005). Среди них есть препараты проходящие клинические испытания, действие которых направлено на снижение агрегации и фосфорилирования белка tau (Gura, 2008; Martinez et al., 2008; Forlenza et al., 2011; Wischik et al., 2009; Yiannopoulou et al., 2013). В недавних исследованиях на трансгенных мышях, моделирующих БА, как вакцинация, так и использование моноклиальных антител имели терапевтический эффект (Boutajangout et al., 2010; Chai et al., 2011; Troquier et al., 2012). Однако, учитывая то, что tau – это внутриклеточный белок, иммунотерапия может быть не очень удачным подходом (Galimberti et al., 2011).

Кроме того, альтернативными подходами являются терапии на основе стволовых клеток, нейтрофинов, усилителей функций митохондрий, противовоспалительные препараты, антиоксиданты, нейропротективные препараты, также, как и препараты, регулирующие уровень холестерина и действующие на сосуды, которые также проходят клинические испытания для лечения БА (Mangialasche et al., 2010; Salomone et al., 2011; Yiannopoulou et al., 2013). Сравнительно недавно было показано, что ультразвуковая терапия включающая направленное действие на гематоэнцефалический барьер, эффективна для очистки мозга от бета-амилоида у мышей, что имеет положительное влияние на когнитивные функции. На данный момент разрабатывается подобная терапия для лечения пациентов. (Burgess et al., 2014)

### **1.7. Кальциевая гипотеза патологии болезни Альцгеймера.**

Изначально так называемая «Кальциевая гипотеза» была предложена в конце 80-х годов XX века доктором Хачатуряном (Khachaturian 1989). Центральным утверждением этой гипотезы было то, что нарушение кальциевого гомеостаза в клетках предшествует развитию нейродегенерации при БА. Данные в пользу этой гипотезы постепенно появлялись в течение

последующих десяти лет, что сделало эту гипотезу достаточно популярной в первое десятилетие XXI века (Berridge, 2009). Согласно данной гипотезе в результате первичного нарушения кальциевого гомеостаза происходит образование амилоидных бляшек, которые в свою очередь оказывают влияние на кальциевые каналы, рецепторы и другие сигнальные молекулы, действуя как положительная обратная связь (Berridge, 2010; Bezprozvanny et al., 2010, Supnet et al., 2010; Mattson 2010; Demuro et al., 2009). Нарушение  $Ca^{2+}$  гомеостаза происходит за счет изменения во многих процессах (метаболических, окислительных, токсических и т.д.). К нарушению  $Ca^{2+}$  гомеостаза также могут приводить различные клеточные процессы, в которых участвуют сигнальные молекулы, ионные каналы, помпы, обменники и другие молекулы. В свою очередь, последствия нарушений гомеостаза могут затрагивать практически все процессы в клетках, вовлеченные в патогенез БА: окислительный стресс, потеря синапсов, регуляция производства и секреции  $A\beta$ , нарушение функции митохондрий, воспаление, гиперфосфорилирование tau (Alzheimer's Association Calcium Hypothesis Workgroup, 2017). На данный момент существует значительное количество данных, подтверждающих предположение, что нарушения в регуляции кальциевого гомеостаза является пред-симптоматическим событием, влияющим на образование амилоида, цитоскелетных аномалий и других клеточных изменений. Связанные с болезнью полиморфизмы и мутации в генах оказывают влияние на кальциевые процессы в клетках. Более того, прием блокаторов кальциевых каналов снижает риск развития деменции, в том числе и БА, у пожилых людей с гипертензией (Hwang et al., 2016). Для современной гипотезы характерна концепция окончательного общего пути: нарушение регуляции концентрации  $Ca^{2+}$  в клетке является окончательным общим событием, приводящим к снижению нормальных функций нейрона и, в конечном итоге, его смертью. Именно устойчивое снижение производительности нейрона создает почву для нейродегенеративных процессов, приводящих к ухудшению производительности в нейронной сети. Эта концепция основана на

предпосылке, что существует несколько альтернативных механизмов нарушения кальциевого гомеостаза. Таким образом, существуют разные пути к снижению функциональности нейрона - производительности. Кальций является общим знаменателем во многих процессах передачи сигналов, включая некоторые пути, которые имеют решающее значение для нормальной функции мозга (например, долгосрочная потенция, механизмы памяти и обучение) и, соответственно, его роль в заболевании, вероятно, связана с нарушением многих процессов.

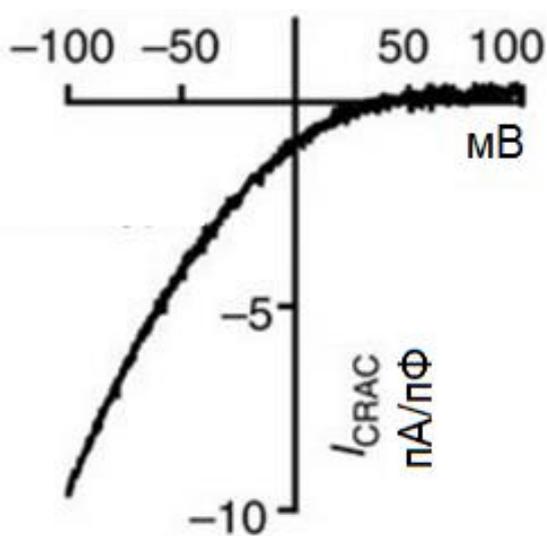
Было обнаружено, что нарушения кальциевого гомеостаза в клетках предшествует симптомам у пациентов с БА (Ito et al., 1994). Подобные изменения также предшествовали симптомам у трансгенных мышей (Chakroborty et al., 2009, Cheung et al., 2010, Chong et al., 2011, Muller et al., 2011, Pratt et al., 2011, Stutzmann et al., 2006; Zhang et al., 2009). Изменения экспрессии сигнальных белков, вовлечённых в регуляцию кальциевого гомеостаза, включая белки кальциевые буферы такие как кальбайдин D-28K, было обнаружено в тканях мозга пациентов с БА в сравнении с пожилыми людьми без БА (Palop et al., 2003; Emilsson et al., 2006). Повышение концентрации кальция в цитоплазме нейронов было обнаружено у трансгенных мышей, моделирующих БА (Lopez et al., 2008; Kuchibhotla et al., 2008).

Многие работы продемонстрировали, что мутации в гене белка пресенилина-1 вызывают нарушения в депонировании кальция в ЭР. Были предложены различные объяснения механизма этих нарушений. Различные группы продемонстрировали, что PS1, возможно, может формировать так называемый канал утечки из ЭР, обеспечивающий постоянный выход кальция из ЭР по градиенту (Tu et al. 2006), что он может регулировать активности рецептора к инозитол-1,4,5-трифосфату (IP3R) и рианодиновый рецептор (Cheung et al. 2008; Rybalchenko et al. 2008; Payne et al., 2010), а также регулировать активность кальциевых АТФ-аз ЭР (SERCA) (Green et al. 2008; Jin et al. 2010).

## 1.8. Депо-управляемые кальциевые каналы.

Нейроны обладают высокоразвитой клеточной системой кальциевой сигнализации, что позволяет тонко регулировать множество специфичных для нейронов функций (Berridge, 1998). Как и, фактически, любая клетка (Clapham, 2007; Moccia et al., 2014c), нейроны используют как внутриклеточный, так и внеклеточные ресурсы кальция для осуществления клеточных процессов (Berridge, 1998). Вход  $\text{Ca}^{2+}$  в нейроны регулируется ионными каналами: потенциал-управляемыми кальциевыми каналами, лиганд-управляемыми ионными каналами и депо-управляемыми кальциевыми каналами (Catterall, 2011; Paoletti et al., 2013). Главным внутриклеточным ресурсом кальция является эндоплазматический ретикулум (ЭР), который распространяется от сомы нейрона в аксоны и дендриты, где располагается также в пре-синаптических окончаниях и шипиках дендритов (Berridge, 1998). Высокая концентрация кальция в просвете ЭР поддерживается за счет работы кальциевых АТФ-аз SERCA. Выброс кальция из ЭР осуществляется через каналы рецептора к инозитол-1,4,5-трифосфату (IP3R) или рианодинового рецептора (RyRs) (Berridge, 1998; Verkhratsky, 2005). Также кальций выходит по градиенту концентрации из ЭР в цитоплазму через так называемые каналы утечки (Tu et al., 2006). Депо-управляемый кальциевый вход осуществляется в ответ на снижение концентрации кальция в ЭР: в случае выброса кальция из ЭР или значительного изменения в концентрации кальция в просвете ЭР в результате изменения в регуляции утечки или накачки кальция (Parekh and Putney, 2005; Brandman et al., 2007; Abdullaev et al., 2008; Sánchez-Hernández et al., 2010; Di Buduo et al., 2014). Депо-управляемые кальциевые каналы лучше всего изучены в электронеовозбудимых клетках. Тем не менее, за последнее десятилетие депо-управляемые кальциевые каналы были обнаружены в различных типах нейронов, где они выполняют роль в регуляции основных нейронных функций (Majewski et al., 2015; Moccia et al., 2015).

В электронеовозбудимых клетках были описаны несколько типов депо-управляемых каналов, отличающихся по своим электрофизиологическим свойствам (Kaznacheyeva et al., 2000; Kaznacheyeva et al., 2001; Gusev et al., 2003; Bugaj et al., 2005; Parekh and Putney, 2005). Наиболее изученными является тип  $I_{CRAC}$  или CRAC, для которого характерны высокая селективность к ионам кальция и низкая проводимость, что отражается в характерной форме вольтамперных характеристик (Рисунок 6). При использовании шумового анализа для измерения проводимости каналов  $I_{CRAC}$ , для них была показана феноменально низкая проводимость – 24 фСм (Zweifach et al., 1993).



*Рисунок 6. Вольтамперные характеристики CRAC каналов. Вольтамперные характеристики CRAC каналов в клетках HEK, экспрессирующих CFP-Orai1, записанные с поверхности всей клетки в конфигурации whole-cell. Внеклеточный раствор содержал (мМ): 130 NaCl; 4,5 KCl; 5,0 HEPES; 10 декстроза; 10 TEA-Cl; 20 CaCl<sub>2</sub> (pH 7,4). Пунеточный раствор содержал (мМ): 135 Cs-Asp; 10 HEPES; 4 MgCl<sub>2</sub>; 10 EGTA; 3.6 CaCl<sub>2</sub> (pH 7,2) (Zhou et al., 2016).*

CRAC каналы образованы белками семейства Orai: Orai1, Orai2 и Orai3. Все три белка образуют каналы, не активирующиеся потенциалом, обладающие сильным входящим выпрямлением, потенциалом реверсии более 60 мВ, селективные к кальцию и с низкой проводимостью (DeHaven et al., 2007; Gwack et al., 2007; Lis et al., 2007; Parekh, 2010). Несмотря на низкую

проводимость, каналы CRAC способны вызывать сильное локальное повышение концентрации кальция в примембранных микродоменах, что делает их идеальными для участия в локальных сигнальных событиях в клетке (Parekh, 2010, 2011).

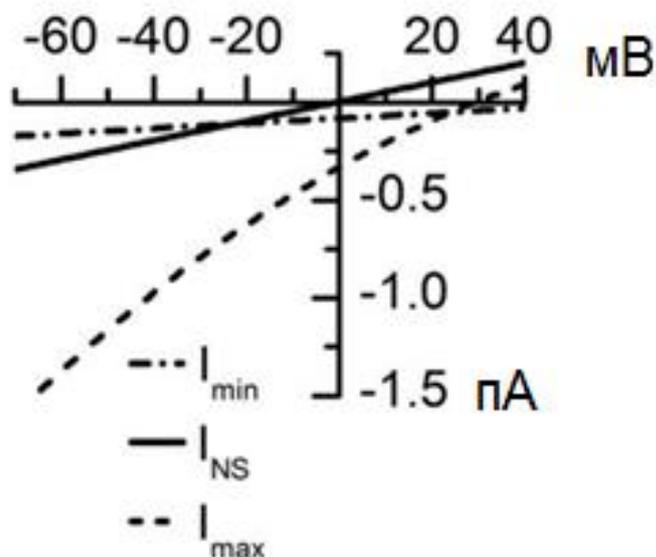


Рисунок 7. Вольт-амперные характеристики токов каналов  $I_{min}$ ,  $I_{max}$  и  $I_{ns}$ . Усредненные вольтамперные характеристики каналов  $I_{min}$ ,  $I_{ns}$  и  $I_{max}$  в клетках HEK293, записанные на одиночном уровне в конфигурации *cell-attached*. Проводимость каналов составляет 1.2 пСм для  $I_{min}$ , 5

пСм для  $I_{ns}$  и 17 пСм для  $I_{max}$ . Пипеточный раствор содержал (мМ): 105 мМ  $BaCl_2$  and 10 мМ Tris-HCl (pH 7,3). Внеклеточный раствор содержал (мМ): 140 KCl, 5 NaCl, 10 K-HEPES (pH 7,4), 1  $MgCl_2$ , 2  $CaCl_2$  (Shalygin et al., 2015).

Кроме CRAC каналов были описаны еще несколько типов нативных депо-управляемых каналов с меньшей селективностью и большей проводимостью (Kaznacheeva et al., 2000; Kaznacheeva et al., 2001; Liu et al., 2004). В работах группы д.б.н. Казначеевой было продемонстрировано наличие кальциевых каналов, активирующихся в ответ на опустошение кальциевых депо в электроневозбудимых клетках, которые отличались по своим свойствам от CRAC каналов. На основании их характеристик проводимости и селективности были выделены еще 3 типа каналов:  $I_{ns}$  (неселективные),  $I_{min}$  (с малой проводимостью) и  $I_{max}$  (с высокой проводимостью) (Рисунок 7) (Kaznacheeva et al., 2000; Kaznacheeva et al., 2001; Gusev et al., 2003; Bugaj et al., 2005; Kaznacheeva et al., 2007; Skopin et al., 2013).

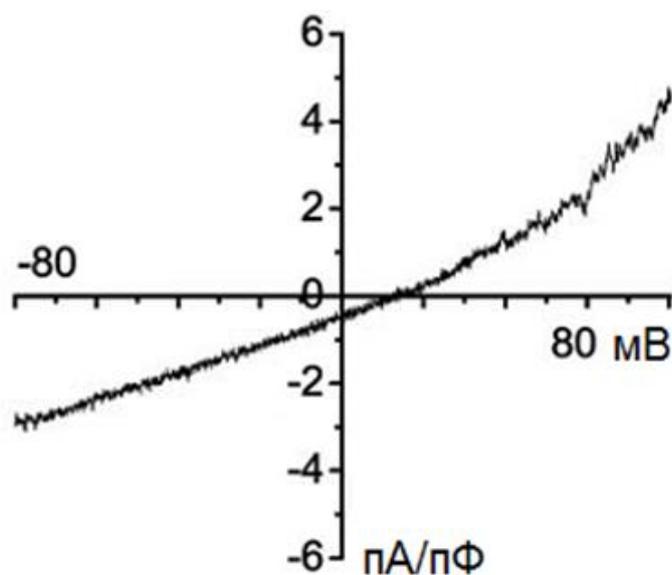


Рисунок 8. Вольтамперные характеристики токов через каналы, образованные белком TRPC1. Вольтамперные характеристики токов через каналы образованные белком TRPC1 в клетках SMG (слюнных желез) мыши, записанные с мембраны всей клетки в конфигурации *whole-cell*. Внеклеточный раствор содержал (мМ): 145 NMDG, 5 CsCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes, 10 глюкоза, pH 7,4. Пипеточный раствор содержал (мМ): 145 CsMeSO<sub>3</sub>, 8 NaCl, 10 MgCl<sub>2</sub>, 10 Hepes, 10 EGTA, pH 7,2 (Liu et al., 2007).

В отличие от CRAC каналов, депо-управляемые каналы с большей проводимостью и меньшей селективностью образованы белками семейства TRPC (Kaznacheeva et al., 2007; Skopin et al., 2013; Shalygin et al., 2015). Наиболее хорошо изученной канальной субъединицей является белок TRPC1 (Ambudkar et al., 2016; Ong et al., 2016). Каналы, образованные белком TRPC1, имеют потенциал реверсии не более 20 мВ (Ambudkar et al., 2016; Ong et al., 2016).

Недавние работы продемонстрировали, что активность каналов TRPC1 зависит от кальциевого входа через каналы Orai1. Локальный кальциевый сигнал необходим для встраивания каналов TRPC1 в плазматическую мембрану (Ambudkar et al., 2016; Ong et al., 2016).

Сигнал об опустошении кальциевых депо (понижении концентрации кальция в просвете ЭР) к каналам на плазматической мембране передается

кальциевыми сенсорами ЭР: STIM1 и STIM2. Эти белки находятся в мембране ЭР и имеют один трансмембранный домен. N-терминальный конец белков STIM направлен в просвет ЭР и имеет два EF-hand домена, связывающих кальций (Рисунок 9). Сенсоры STIM1 и STIM2 отличаются по чувствительности EF-hand доменов к концентрации кальция в ЭР. Константа диссоциации для STIM1 ~ 200 мкМ, в то время как для STIM2 ~400 мкМ. Эти различия в чувствительности приводят к тому, что сенсоры по-разному активируются в ответ на понижение концентрации кальция в ЭР: STIM2 реагирует уже на небольшие изменения в концентрации, а STIM1 работает по принципу "все-или-ничего" и нуждается в сильном понижении концентрации кальция (Brandman et al., 2007).

Белки STIM претерпевают существенные изменения в конформации, позволяющие им образовывать олигомеры и связываться С-терминальным концом с белками, образующими депо-управляемый канал. Канонический EF-hand домен взаимодействует с кальцием, а неканонический домен стабилизирует канонический. В состоянии покоя EF-hand домены взаимодействуют с SAM-доменом на N-терминальном конце белка. Диссоциация кальция приводит к дестабилизации этого взаимодействия, раскручиванию домена и передаче сигнала активации и олигомеризации (Prakriya et al., 2015). В состоянии покоя STIM1 находится в состоянии димера и олигомеризуется в процессе активации. Главную роль в олигомеризации также играют EF-hand и SAM-домены, а CC2-CC3 и CAD домены стабилизируют олигомеры (Fahrner et al., 2014; Prakriya et al., 2015). STIM2 имеет более медленную кинетику раскручивания EF-hand-SAM домена и замедленную скорость олигомеризации, с чем связывают более медленную скорость активации депо-управляемых каналов этим белком. На цитоплазматическом участке STIM находятся ингибиторный домен (ID) и домен активирующий депо-управляемые каналы (SOAR). Изменение конформации белка приводит к высвобождению SOAR домена от ID домена, делая возможным взаимодействие с депо-управляемыми каналами. SOAR

домены STIM1 и STIM2 также отличаются по способности связываться с Orai1. Петли S $\alpha$ 1 и S $\alpha$ 2 домена SOAR белка STIM1 позволяет ему сильнее взаимодействовать и активировать Orai1 по сравнению со STIM2. Самый конец С-терминального участка ответственен за взаимодействие STIM с липидами в ПМ: STIM2 взаимодействует как с PIP2, так и с PIP3, в то время как STIM1 в основном взаимодействует с PIP2 (Рисунок 9) (Luik et al., 2008; Zhou et al., 2009; Zheng et al., 2011; Gudlur et al., 2014; Prakriya et al., 2015).

Было продемонстрировано, что структурные различия белков STIM1 и STIM2 определяют их функциональную значимость для клеточных процессов. По всей видимости, STIM2 является регулятором концентрации кальция в цитоплазме и ЭР за счет своей чувствительности к изменениям в концентрации кальция. В тоже время его слабое взаимодействие с Orai1 не позволяет активировать сильный конститутивный вход кальция в клетку. Для STIM1 нужен сильный сигнал опустошения кальциевых депо, с чем связана его функциональная значимость в ответе на стимуляцию рецепторов сопряженную с выбросом кальция из ЭР (Soboloff et al., 2012; Prakriya et al., 2015). В процессе активации олигомеры STIM перемещаются к ПМ в области плотных контактов ПМ и ЭР. Структуры, которые образуют олигомеры STIM в таких участках называют puncta (Soboloff et al., 2012; Prakriya et al., 2015).

STIM белки активируют все три типа субъединиц Orai (Frischauf et al., 2009). Взаимодействие белков STIM1 и TRPC1 также было продемонстрировано с помощью различных методов. Активность STIM1 необходима для активности каналов TRPC1, и при усилении активности STIM1 происходит усиление активности каналов, образованных TRPC1 (Yuan et al., 2007; Zeng et al., 2008; Cheng et al., 2013; Asanov et al., 2015). Лизин-богатый участок в PBD домене на С-конце белка STIM1 играет важную роль во взаимодействии с PIP2 и PIP3 в мембране, а также участвует в активации каналов TRPC1. Два остатка Asp в последовательности белка TRPC1 (639-640) взаимодействуют электростатически с двумя Lys в С-терминальной области STIM1 (684-685) (Worley et al., 2007; Zeng et al., 2008).

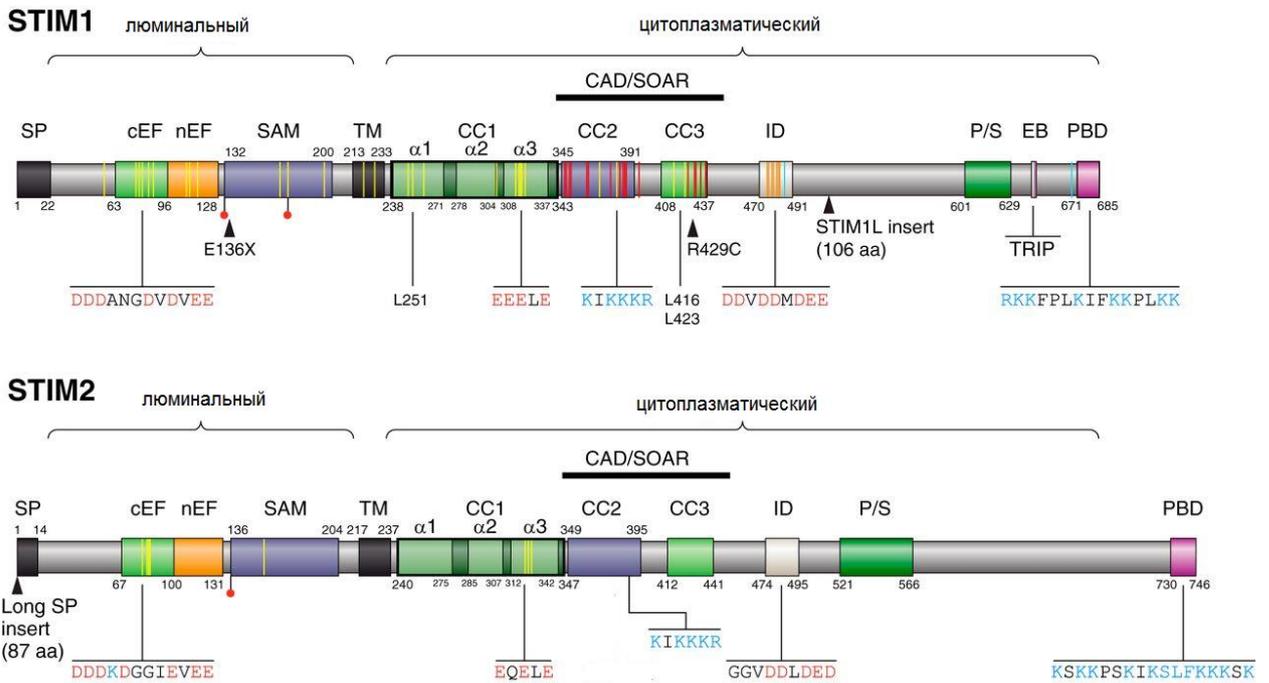


Рисунок 9. Доменная организация белков *STIM1* и *STIM2* (Prakriya et al., 2015 с изменениями). Структурные и функциональные домены выделены цветом (*SP*, signal peptide – сигнальный пептид; *cEF*, канонический *EF hand*; *nEF*, неканонический *EF hand*; *SAM* домен; *TM*, трансмембранный домен; *CC1-3*, coiled-coil домены 1–3; *CAD*, *CRAC* активирующий домен; *SOAR*, *STIM-Orai* активирующий участок; *ID*, ингибиторный домен; *P/S*, домен богатый на пролин-серин; *EB*, *EB1* связывающий домен; *PBD* домен). Показаны аминокислоты, мутации в которых приводят к конститутивной активности (желтый), ингибируют активность (красный), нарушают кальциевую инактивацию (оранжевый), предотвращают связывание с *EB1* (пурпурный), ингибируют депо-управляемый вход во время митоза (голубой). Кругами обозначены сайты гликозилирования (*N131*, *N171* для *STIM1* и *N135* для *STIM2*).

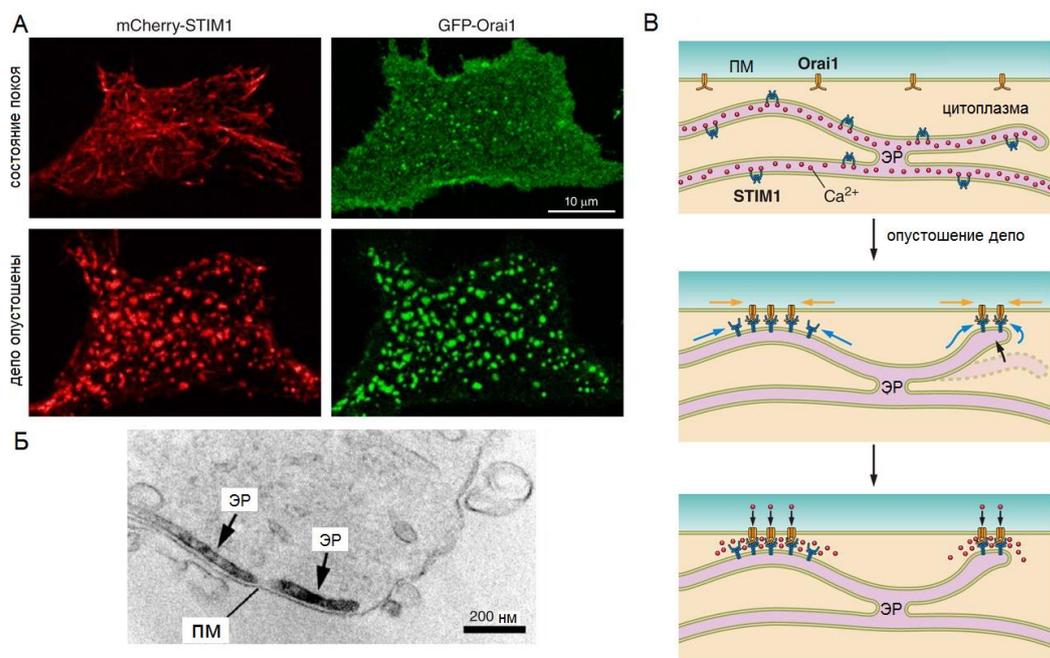


Рисунок 10. *STIM1* и *Orai1* накапливаются в участках контакта ЭР с ПМ для формирования молекулярного комплекса для депо-управляемого кальциевого входа. (Prakriya et al., 2015 с изменениями). А. *mCherry-STIM1* и *GFP-Orai1* распределены равномерно в мембранах ЭР и ПМ в состоянии покоя в клетках HEK293. После нескольких минут опустошения кальциевых депо белки колокализуются в ринкта в примембранной области. Б. Ринкта HRP-STIM1 локализованы в области контактов ЭР и ПМ после опустошения депо, как это видно на снимке препарата клеток Jurkat T, сделанного с помощью электронной микроскопии. В. Схема, демонстрирующая события в клетке после опустошения кальциевых депо (ЭР): активированные STIM перемещаются к областям контакта ЭР и ПМ, где взаимодействуют с кальциевыми каналами.

Экспрессия белков, вовлеченных в депо-управляемый вход, была показана в мозге мышей и человека (Dziadek and Johnstone, 2007; Gross et al., 2007; Gwack et al., 2007; Wissenbach et al., 2007; Berna-Erro et al., 2009; Gruszczynska-Biegala et al., 2011; Steinbeck et al., 2011; Hartmann et al., 2014). Экспрессия канальных субъединиц и сенсоров STIM отличается в различных типах нейронов и отделах мозга. Наибольший уровень белка Stim1 наблюдается в молекулярном слое мозжечка (Klejman et al., 2009; Skibinska-Kijek et al., 2009;

Hartmann et al., 2014). В тоже время STIM2 является доминирующим в гиппокампе (Berna-Erro et al., 2009; Skibinska-Kijek et al., 2009). Одинаковый уровень экспрессии STIM1 и STIM2 обнаружены в коре, таламусе и миндалевидном теле (Skibinska-Kijek et al., 2009; Hartmann et al., 2014). Оба STIM1 и STIM2 присутствуют в мозге человека и демонстрируют наибольший уровень экспрессии в коре и гиппокампе (Steinbeck et al., 2011). На клеточном уровне STIM1 и STIM2 располагаются в мембране ЭР в соме, первичных и вторичных дендритах мышинных гиппокампальных, кортикальных нейронах и нейронах Пуркинье (Klejman et al., 2009; Skibinska-Kijek et al., 2009; Sun et al., 2014). STIM1 найден в области пост-синаптической плотности (PSD, post-synaptic density) (Williams et al., 2001; Keil et al., 2010). Orai1 экспрессируется в мозге мыши практически во всех участках (Klejman et al., 2009), при этом уровень экспрессии Orai2 значительно выше, а Orai3 не был обнаружен в мозге, но найден в спинном мозге (Berna-Erro et al., 2009; Xia et al., 2014). Orai1 расположен в соме и первичных дендритах мышинных нейронов (Klejman et al., 2009). Опустошение кальциевого депо в ЭР вызывает перемещение и ко-локализацию Orai1 и STIM1 в puncta в нейронах также как это было показано в электронеозбудимых клетках (Klejman et al., 2009; Ng et al., 2011). STIM1 и Orai1 локализуются в грибовидных шипиках нейронов при участии синаптоподина (SP), который связывается с актином и участвует в регуляции депо-управляемого входа в нейронах (Korkotian et al., 2014; Segal and Korkotian, 2014). SP-зависимый кальциевый сигнал участвует в регуляции увеличения головы шипика в процессе долговременной потенциации в CA1 участке в гиппокампе, а также важен для таких важных процессов как обучение (Deller et al., 2003; Korkotian et al., 2014). В частности, SP усиливает глутамат-индуцированный кальциевый выброс в шипиках дендритов в нейронах (Vlachos et al., 2009). Недавно было сделано предположение, что SP регулирует кальциевые сигналы, участвуя в перемещении STIM1 и Orai1 в область PSD (Korkotian et al., 2014; Segal and Korkotian, 2014). Возможно, что SP также регулирует перемещение STIM1 для регуляции пост-синаптического

TRPC3, участвующего в глутаматергической синаптической передаче в мозжечке (Hartmann et al., 2014). Депо-управляемый вход, регулируемый белком STIM2, также вовлечен в образование грибовидных шипиков в гиппокампе (Sun et al., 2014). STIM2 необходим для регуляции фосфорилирования и перемещения AMPA рецепторов к плазматической мембране и обратно, что, по всей вероятности, объясняет его необходимость для долговременной потенциации (Garcia-Alvarez et al., 2015; Garcia-Alvarez et al., 2015; Yip et al., 2017). Вход кальция через депо-управляемые каналы, регулируемые STIM2 активируют киназу CaMKII, активность которой стабилизирует форму шипика в отсутствие синаптической активности (Sun et al., 2014). Активность депо-управляемых каналов повышает концентрацию кальция в дендритах в процессе тетанической стимуляции и участвует в генерации долговременной потенциации в синапсах коллатерали Шаффера и CA1 гиппокампа (Baba et al., 2003). Orai1 вовлечен в регуляцию пластичности за счет своей роли в наполнении кальциевого депо ЭР (Tshuva et al., 2017). Было показано, что депо-управляемый вход участвует в регуляции транскрипции, в регуляции возбудимости и энергетического метаболизма и росте нейритов (Kann et al., 2012; Mitchell et al., 2012; Shim et al., 2013; Lalonde et al., 2014). Также депо-управляемый вход участвует в регуляции экспрессии генов и пролиферации в клетках предшественниках нейронов (Somasundaram et al., 2014). Таким образом, очевидно, что депо-управляемый вход кальция играет роль в регуляции важнейших процессов в нейронах. Следствием этого является обнаружение нарушений регуляции депо-управляемого входа кальция в различных заболеваниях нервной системы. У стареющих *in vitro* нейронов было обнаружено подавление депо-управляемого входа и снижение уровня экспрессии Orai1 и STIM1 (Calvo-Rodríguez et al., 2016). В условиях глутаматной эксайтоксичности STIM2 участвует в регуляции уровня холестерина в синаптической мембране (Sodero et al., 2012).

### 1.9. Нарушения депо-управляемого входа в патологии заболеваний ЦНС.

Болезнь Паркинсона – это втрое по частоте нейродегенеративное заболевание, характеризующееся потерей дофаминэргических нейронов в области *substantia nigra pars compacta*. Потеря нейронов в этой области приводит к уменьшению моторной активности, усиленному тремору, напряжению мышц, брадикинезии и ортостатической неустойчивости (Daue et al., 2003; Marras et al., 2008). Большинство случаев болезни имеет идиопатическое происхождение, и механизмы вызывающее патологию не до конца изучены (Abou-Sleiman et al., 2006). Нейротоксин МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) является предшественником МФП+, вызывающего постоянные симптомы болезни Паркинсона, разрушая дофаминэргические нейроны в чёрной субстанции. Этот токсин широко используется для моделирования болезни Паркинсона. МФТП проникает через гематоэнцефалический барьер и поглощается глиальными клетками, в которых он метаболизируется до МФП+. Затем МФП+ выделяется во внеклеточное пространство и специфически переносится транспортерами дофамина в дофаминэргические нейроны, где ингибирует активность митохондриального комплекса I в дыхательной цепи (Chiba et al., 1984; Kitahama et al., 1991; Przedborski et al., 2004). На клеточном уровне последствиями этого воздействия являются нарушения кальциевого гомеостаза и окислительный стресс (Javitch et al., 1985; Lotharius et al., 1999). Было продемонстрировано, что канал, образованный белками TRPC1, играет критическую роль для выживания клеток SH-SY5Y и PC12. Обработка этих клеток МФП+ приводит к сниженной экспрессии белка TRPC1, уменьшению количества TRPC1 взаимодействующего со STIM1, понижению депо-управляемого входа кальция и ЭР стрессу. Оверэкспрессия функционального TRPC1 восстанавливала депо-управляемый вход кальция, восстанавливало уровень кальция в ЭР и устраняло ЭР стресс. Кальциевый вход через TRPC1 активировал в этих клетках сигнальный путь mTOR/АКТ, необходимый для

выживания нейронов. У мышей с двойным нокаутом белка TRPC1 были отмечены уменьшение количества нейронов черной субстанции и активация ЭР стресса в нейронах. Более того, анализ тканей мозга пациентов с болезнью Паркинсона также показало увеличенный уровень ЭР стресса и уменьшение уровня TRPC1 в нейронах черной субстанции. Восстановление экспрессии TRPC1 у нокаутных мышей запускало активность АКТ/mTOR пути и увеличивало выживаемость нейронов черной субстанции в ответ на нейротоксин МФП+. Таким образом, выживаемость нейронов черной субстанции зависит от сигнального каскада, запускаемого в ответ на вход кальция через каналы TRPC1, и необходимого для устранения ЭР стресса (Selvaraj et al., 2009; Selvaraj et al., 2012; Li et al., 2013; Chen et al., 2013a; Chen et al., 2013b; Li et al., 2014). Нарушение депо-управляемого входа было продемонстрировано непосредственно в клетках пациентов с болезнью Паркинсона (Zhou et al., 2016).

Амиотрофический латеральный склероз (АЛС) – это нейродегенеративное заболевание затрагивающее преимущественно моторные нейроны. Большинство случаев заболевания не имеют ясных причин и классифицируются как спорадическая форма, в то время как меньшее количество случаев генетически детерминирована мутациями в гене *SOD1*, вызывающими наследственную форму этого заболевания. (Robberecht and Philips, 2013). Большое количество данных говорит в пользу того, что заболевание вызвано в том числе негативным влиянием на нейроны соседних глиальных клеток (Шева et al., 2009). Более того, астроциты, взятые у мышей, моделирующих АЛС, или пациентов со спорадической формой АЛС индуцируют смерть мотонейронов в культуре (Di Giorgio et al., 2007; Nagai et al., 2007; Marchetto et al., 2008; Haidet-Phillips et al., 2011). Недавно было продемонстрировано, что астроциты полученные у трансгенных мышей, моделирующих АЛС имеют нарушения кальциевого гомеостаза – в том числе, усиление входа кальция через депо-управляемые каналы и увеличенную концентрации кальция в ЭР. Было обнаружено, что в астроцитах с мутацией

SOD1G93A кальциевые сенсоры STIM1 локализуются в примембранной области без предшествующего сигнала опустошения депо. Таким образом, в таких астроцитах возможна усиленная конститутивная активность депо-управляемых кальциевых каналов и увеличенный вход кальция, вызывающий повышенную концентрацию кальция в ЭР. Причиной кальций-независимой активации кальциевых сенсоров STIM1 являлось S-глютатионилирование в результате усиленного окислительного стресса. Каналы опосредующие усиленный вход кальция в клетку имели проводимость характерную для каналов, образованных белками Orai, но не TRPC, что подтверждает ранее полученные данные о составе депо-управляемых кальциевых каналов в астроцитах (Kawamata et al., 2014).

Эпилепсия – это заболевание нервной системы, причиной которого является гиперактивность и гиперсинхронизованная активность нейронов (Zamponi et al., 2010). Эпилептические судороги могут иметь различное происхождение, включая повреждения мозга и генетическую предрасположенность (Vadlamudi et al., 2003). Для создания модели хронической эпилепсии *in vivo* используют пилокарпин, который вызывает единичный случай status epilepticus, который затем приводит к прогрессивным функциональным и структурным изменениям в ЦНС с появлением периодических непроизвольных судорог. Изменения сопровождаются переключением режима активности пирамидальных нейронов гиппокампа с регулярного на спайковую активность на несколько дней после status epilepticus. (Azouz et al., 1996. Sanabria et al., 2001). Спонтанно активные пирамидальные нейроны могут вовлечь целую популяцию CA1 пирамидальных клеток в синхронизированные электрические разряды. (Sanabria et al., 2001). С использованием этой модели эпилепсии на мышах было продемонстрировано, что в ядрах гиппокампа значительно увеличивается экспрессия белков STIM1 и STIM2. Такое же увеличение экспрессии этих белков было обнаружено в тканях головного мозга пациентов с эпилепсией. Было обнаружено, что ингибиторы депо-управляемого входа

кальция 2-APB и ML-9 обратимо снижают уровень спайковой активности нейронной сети (Steinbeck et al., 2011).

Болезнь (хорея) Гентингтона – это аутосомно-доминантное генетическое нейродегенеративное заболевание, причиной которого является увеличение количества глутаминов в аминокислотной последовательности белка Гентингтина (или Хантингтина, Huntingtin, Htt) в области так называемого поли-глутаминового тракта (polyQ), состоящего из повторов глутаминовых остатков. Манифестация болезни начинается при повышении количества повторов более 36 (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). При данном заболевании происходит потеря срединных шипиковых нейронов стриатума (medium spiny neurons, MSN), которая приводит к возникновению симптомов заболевания, которые включают: хорею, психиатрические нарушения и деменцию (Vonsattel and DiFiglia, 1998). Было обнаружено, что депо-управляемый вход, опосредованный каналами TRPC1, значительно усилен в нейронах MSN трансгенных мышей с 128 повторами в polyQ тракте. Ингибирование депо-управляемого входа с помощью соединения EVP4593 оказывало нейропротекторное действие на нейроны мышей в культуре, а также снижало проявление симптомов у дрозофил, моделирующих болезнь Гентингтона, при применении *in vivo* (Wu et al., 2011; Czeredys et al., 2017). Увеличение депо-управляемого входа кальция, по всей вероятности, опосредовано суперпозицией активностей каналов Orai1 и TRPC1 (Vigont et al., 2015). В клетках MSN человека, полученных путем перепрограммирования и дифференцировки непосредственно клеток пациентов, также был обнаружен увеличенный депо-управляемый вход кальция, чувствительный к EVP4593 (Nekrasov et al., 2016).

Многие исследователи связывают нарушения депо-управляемого входа кальция с патологией БА (Leisring et al., 2000; Yoo et al., 2000; Herms et al., 2003; Bojarski et al., 2009; Shideman et al., 2009; Ma et al., 2012; Jaworska et al., 2013; Sepulveda-Falla et al., 2014; Sun et al., 2014; Wegierski et al., 2016). Изменения в уровне депо-управляемого входа кальция были показаны

непосредственно в лимфоцитах пациентов как со спорадической, так и с наследственной формами заболевания (Bojarski et al., 2009; Jaworska et al., 2013) Эти изменения, по всей вероятности, не связаны с Аβ (Herms et al., 2003; Wegierski et al., 2016). Несмотря на многочисленные работы, демонстрирующие связь БА и нарушений работы депо-управляемого входа кальция, клеточный механизм по которому происходят изменение активности депо-управляемых каналов до сих пор непонятен. Была предложена гипотеза об изменении уровня экспрессии белков STIM, однако эти данные противоречивы (Bojarski et al., 2009; Sun et al., 2014). Существует много работ, которые демонстрируют изменение в депонировании кальция в ЭР в моделях БА (Tu et al. 2006; Cheung et al. 2008; Green et al. 2008; Rybalchenko et al. 2008; Jin et al. 2010; Payne et al., 2010), что объясняет прямое влияние на депо-управляемые каналы. Однако молекулярный механизм передачи патологического сигнала от депо к каналам остается неизученным.

#### **1.10. Ингибиторы депо-управляемого кальциевого входа.**

Интенсивное изучение депо-управляемых каналов в норме и патологии вызывает необходимость в поиске специфических ингибиторов депо-управляемого кальциевого входа. Ингибиторы или модуляторы депо-управляемого входа могут быть нацелены на различные молекулярные мишени: каналы Orai или TRPC, или сенсоры STIM. Механизм их действия может включать прямое влияние на пору канала или на взаимодействие STIM–Orai (Tian et al., 2016).

##### **1.10.1. Лантаноиды.**

Депо-управляемые кальциевые каналы, также, как и другие кальциевые каналы, могут быть ингибированы трехвалентными катионами. В частности, каналы Orai демонстрируют высокую чувствительность к лантану La<sup>3+</sup> (lanthanum) и гадолинию Gd<sup>3+</sup> (gadolinium) и могут быть блокированы микромолярными концентрациями этих ионов. Это свойство часто

используется для того, чтобы отличить активность этих каналов от менее селективных каналов, относящихся к семейству TRP (Mason et al., 1991; Hoth et al., 1993; Yeromin et al., 2006; McNally et al., 2012). Действие трехвалентных катионов на активность каналов связана с непосредственным влиянием на пору канала.

#### 1.10.2. Соединения имидазола.

Имидазольный антимикотитик SKF-96365 (Рисунок 11) был первым обнаруженным ингибитором депо-управляемого входа, действующим в микромолярных концентрациях (Franzius et al., 1994; Chung et al., 1994). Структурно похожие имидазольные соединения эконазол и миконазол, используемые в качестве антимикотиков, также ингибируют депо-управляемый вход. Однако, эти соединения не являются строго селективными и ингибируют активность других ионных каналов: потенциал-управляемых кальциевых каналов и цАМФ-активируемых каналов в близких по значению концентрациях (Chung et al., 1994; Singh et al., 2010).

#### 1.10.3. Соединения дифенил бората.

2-Аминоэтоксидифенил борат (2-Aminoethyldiphenyl borate, 2-APB) широко используется в качестве ингибитора депо-управляемого входа (Рисунок 11) (Bootman et al., 2002; Tian et al., 2016). Его фармакологическая активность зависит от концентрации: в низких микромолярных концентрациях (1–10 мкМ) он может оказывать активирующее действие на депо-управляемый вход, в то время как концентрации порядка 20–100 мкМ оказывают сильное ингибирующее действие. Предполагалось, что действие 2-APB обусловлено его влиянием на рецептор к IP<sub>3</sub>, однако дальнейшие исследования продемонстрировали, что это не так (Prakriya et al., 2001). 2-APB действует на изоформы Orai по-разному: он ингибирует активность Orai1 и Orai2, но активирует Orai3 (Lis et al., 2007; Dehaven et al., 2008; Schindl et al., 2008).

Было обнаружено, что 2-APB не влияет на способность образовывать димер белка STIM1, но усиливает внутримолекулярное взаимодействие между его доменами CC1 и SOAR, что приводит к последующему ингибированию образования панкта. Также было обнаружено, что 2-APB блокирует кальциевый вход через конститутивно активные мутанты Orai1-P245T и Orai1-V102A, чья активность не зависит от STIM1, но в тоже время мутант Orai1-V102A не ингибировался в отсутствие связи белка со STIM1. Этот мутант был использован для того, чтобы проверить нарушает ли 2-APB связывание между Orai1 и STIM1. 2-APB действительно нарушал связывание, но не напрямую, а воздействуя на STIM1, а также, вероятно, на N-терминальный конец Orai1 (Ali et al., 2016; Wei et al., 2016; Xu et al., 2016). Данный ингибитор имеет потенциал в области разработки лекарственных препаратов, так как оказывает потенцирующее действие на активность хлорохина (chloroquine) против малярийного плазмодия, устраняя резистентность к препарату как *in vitro* так и *in vivo* у мышей (Mossaad et al., 2015).

Существуют данные о неспецифическом влиянии 2-APB на потенциал-управляемые каналы, помпы SERCA и каналы TRPV, активируемые температурой (Tian et al., 2016). Сравнительно недавно в лаборатории профессора Микошиба были получены новые производные DPB162-AE и DPB163-AE (Рисунок 11), которые продемонстрировали большую специфичность и ингибиторную активность в меньших концентрациях ( $IC_{50} \approx 600$  нМ и  $IC_{50} \approx 200$  нМ), что делает их более привлекательными для разработок потенциальных лекарственных препаратов (Goto et al., 2010; Hendron et al., 2014).

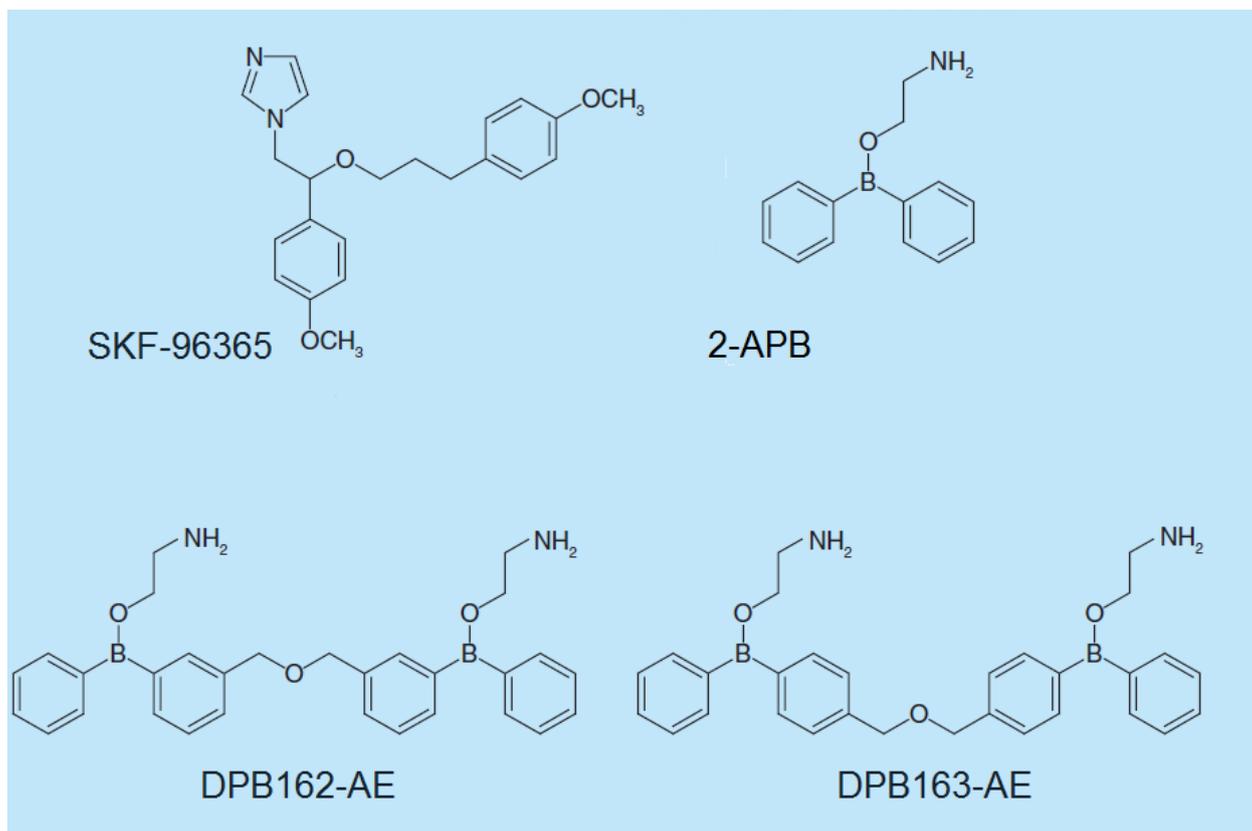


Рисунок 11. Формулы ингибиторов депо-управляемых кальциевых каналов: SKF-96365; 2-APB; DPB162-AE; DPB163-AE (цитируется по Tian et al., 2016 с изменениями).

#### 1.10.4. Соединения пиразола: ВТР.

Серия ингибиторов относящихся к бис(трифторметил)пиразолам (bis(trifluoromethyl)pyrazol), известным как ВТР1, ВТР2 и ВТР3, была открыта в качестве ингибиторов и продукции цитокинов Т-клетками (Djuric et al., 2000; Trevillyan et al., 2001; Chen et al., 2002). Интересно, что в отличие от других хорошо известных ингибиторов FK506 и циклоспорина А, данные вещества не действовали напрямую на кальциейрин, воздействуя на вышестоящий кальциевый сигнал. Позднее было обнаружено, то они ингибировали депо-управляемый вход кальция во многих типах клеток в концентрации от микромолей до наномолей ( $IC_{50} \approx 100$  нМ), демонстрируя сильную специфичность сравнительно потенциал-управляемым кальциевым каналам. В частности, ВТР2 (Рисунок 12), также известный как УМ-58483, был эффективен в наномолярных концентрациях для ингибирования депо-

управляемого кальциевого входа в клетках Jurkat T, при этом не затрагивая фосфорилирования PLC $\gamma$ 1 и TCR-активируемого выброса кальция из ЭР (Ishikawa et al., 2003). Механизм действия данных ингибиторов не до конца понятен. Существовало предположение, что VTR2 воздействует на белок дебрин, участвующий в регуляции актинового цитоскелета. Однако, данные о роли цитоскелетных белков в регуляции депо-управляемого кальциевого входа являются противоречивыми (Ribeiro et al., 1997). Данные ингибиторы также воздействуют на активность каналов TRPM4, TRPC3 и TRPC5 (He et al., 2005; Takezawa et al., 2006).

#### 1.10.5. Соединения пиразола: Pур.

Сравнительно недавно производные пиразола Pур3, Pур6 и Pур10 (Рис.12) показали селективное влияние на депо-управляемый вход кальция в клетках HEK293 и RBL-2H3 (Schleifer et al., 2012). Pур6 и Pур10 структурно похожи на VTR и имеют две трифторметильные группы по положениям C3 и C5 пиразольного кольца, которые важны для ингибирования каналов Orai. Pур3 в тоже время имеет карбоксильную группу в позиции C4 пиразольного кольца и трихлоракрильную группу боковой цепи, которые обеспечивают ингибиторную активность в отношении Orai и TRPC3 (Schleifer et al., 2012). Pур6 показывает большую ингибиторную активность в отношении каналов Orai, чем TRPC3, в тоже время Pур10 более селективен для TRPC3 (Tian et al., 2016).

#### 1.10.6. Соединения пиразола: GSK.

Компания GlaxoSmithKline обнаружила соединения пиразола GSK-5498A, GSK-5503A and GSK-7975A (Рисунок 12), которые ингибировали активность каналов Orai (Ashmole et al., 2012; Derler et al., 2013; Rice et al., 2013). Соединения проявляли свою ингибиторную активность в микромолярных концентрациях ( $IC_{50} \approx 1-4$  мкМ) в клетках HEK293 в отношении Orai1 и Orai3 (Derler et al., 2013; Rice et al., 2013). Соединения не влияли на олигомеризацию

STIM1 или взаимодействие STIM1-Orai. Предполагается, что активность ингибиторов связана с непосредственным влиянием на пору канала, так как для ингибирования менее селективного мутанта Orai E106D требуется на порядок большая концентрация вещества (Rice et al., 2013). Эффект данных соединений был сравнительно селективным в отношении Orai, и не затрагивал многие другие ионные каналы, но, в тоже время, GSK ингибировали каналы TRPV6 (Rice et al., 2013; Owsianik et al., 2006).

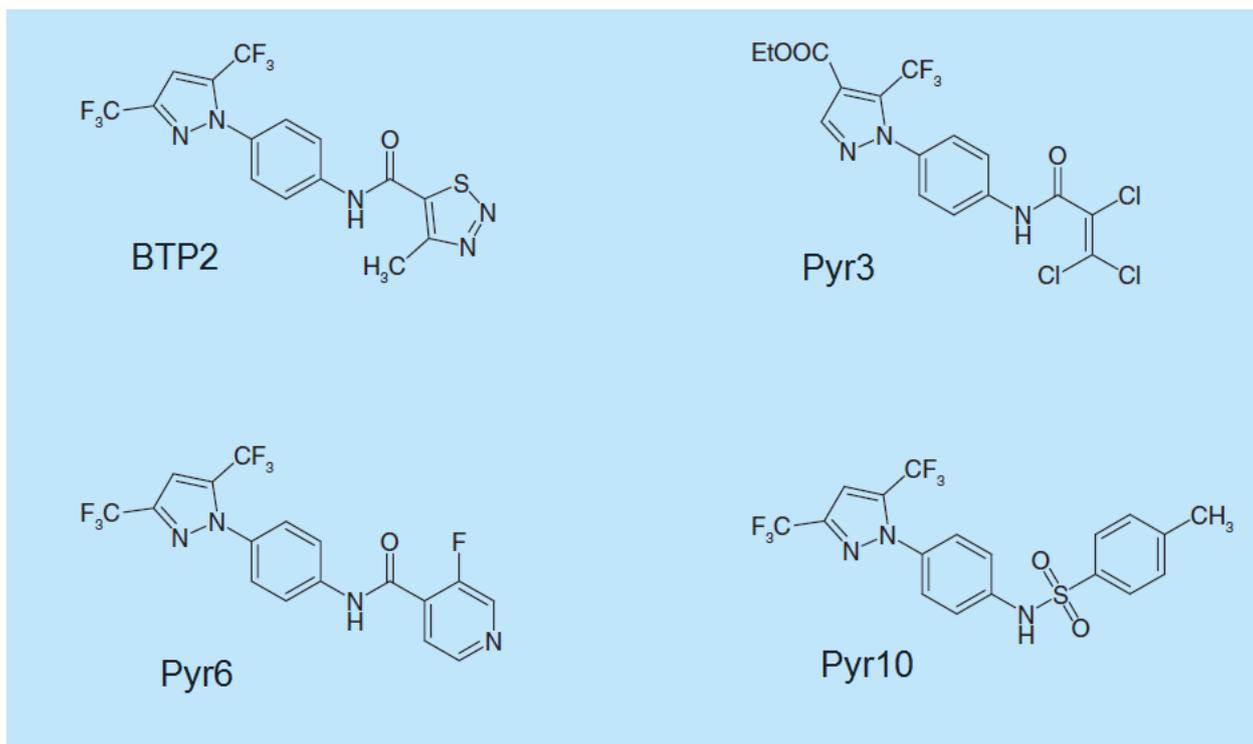


Рисунок 12. Формулы ингибиторов депо-управляемых кальциевых каналов: BTP2, Pyr3, Pyr6 и Pyr10 (цитируется по Tian et al., 2016 с изменениями).

#### 1.10.7. Synta 66.

Synta 66 (Рисунок 13)— селективный ингибитор депо-управляемых кальциевых каналов, разработанный компанией Synta pharmaceuticals (Ng et al., 2008). По структуре он похож на Pyr6, в котором 3,5-биструорометил пиразольное кольцо заменено на 2,5-диметокси бензольное кольцо. Это вещество ингибировало депо-управляемый вход кальция в микромолярных концентрациях ( $IC_{50} \approx 1.4$  мкМ) в клетках RBL, но не влиял на активность на кальциевую АТФ-азу и калиевые каналы обратного выпрямления (Ng et al.,

2008; Di Sabatino et al., 2009). Биохимический анализ показал, что Synta 66 в концентрации 10 мкМ не оказывает влияния на важнейшие рецепторы, ферменты и ионные каналы (Di Sabatino et al., 2009). Тем не менее, механизм действия Synta 66 остается неизвестным.

#### 1.10.8. ML-9.

ML-9 (Рисунок 13) является ингибитором киназы легкой цепи миозина (MLCK), который также обратимо подавляет активность депо-управляемых кальциевых каналов в микромолярных концентрациях ( $IC_{50} \approx 10$  мкМ) (Watanabe et al., 1996; Smyth et al., 2008). Механизм действия ингибитора не до конца понятен, но частично связан с ингибированием образования пункта белком STIM1, за счет снижения его перемещения к плазматической мембране. Сайт связывания ML-9 со STIM1 неизвестен, также как неизвестно имеет ли место прямое взаимодействие или влияние опосредовано. В тоже время эффект ингибирования не связан с влиянием на MLCK (Smyth et al., 2008).

#### 1.10.9. Диэтилстилбестрол.

Диэтилстилбестрол (Diethylstilbestrol, DES) (Рисунок 13) – синтетический агонист эстрогена, который ингибирует депо-управляемый кальциевый вход в клетках молочной железы, гладкой мускулатуры сосудов и микроглие. DES показывает ингибиторную активность при микромолярных концентрациях ( $IC_{50} \approx 0,6$  мкМ) и не оказывает влияния на TRPM7. Эксперименты показали, что сайт связывания с ингибитором находится снаружи клетки, что предполагает влияние непосредственно на ионные каналы (Zakharov et al., 2004; Ohana et al., 2009).

#### 1.10.10. Карбоксиамидотриазол.

Карбоксиамидотриазол (Carboxyamidotriazole, CAI) (Рисунок 13) является потенциальным противораковым препаратом, который на данный момент был

протестирован в I и II фазах клинических испытаний и показал ингибиторную активность в отношении ангиогенеза, роста опухоли, инвазии и метастазирования (Kohn et al., 2001; Hussain et al., 2003). CAI был изначально идентифицирован как ингибитор депо-управляемых кальциевых каналов в электронеовозбудимых клетках с эффективностью в микромолярных концентрациях ( $IC_{50} \approx 0,5$  мкМ) (Rodland et al., 1997; Hoth et al., 2000; Kohn et al., 2001; Hussain et al., 2003). CAI ингибирует депо-управляемый кальциевый вход путем подавления производства IP3 и деполяризации митохондрий, что приводит к кальций-зависимой инактивации депо-управляемых каналов (Hoth et al., 2000; Glitsch et al., 2002; Mignen et al., 2005).

#### 1.10.11. RO2959.

RO2959 (Рисунок 13) был синтезирован компанией Synta Pharmaceutical и затем был идентифицирован в качестве селективного и мощного ингибитора депо-управляемых кальциевых каналов компанией Roche. RO2959 ингибирует в низких концентрациях ( $IC_{50} \approx 400$  нМ) при условии преинкубации с раствором веществ. В клетках T-REx-CHO, стабильно экспрессирующих STIM1/Orai1, STIM1/Orai2 или STIM1/Orai3, RO2959 ингибирует Orai1 в большей степени нежели Orai2 или Orai3. RO2959 не оказывает влияния на многие важнейшие рецепторы, транспортеры и ионные каналы, включая ГАВА рецепторы, дофаминовые транспортеры, сератониновые транспортеры, потенциал-управляемые калиевые каналы, хлорные каналы, TRPC1, TRPM2, TRPM4 каналы Cav1.2. Несмотря на высокую специфичность и эффективность ингибитора, его механизм действия еще не изучен (Chen et al., 2013).

#### 1.10.12. Линолевая кислота.

Линолевая кислота (Рисунок 13) — одноосновная карбоновая кислота с двумя изолированными двойными связями  $CH_3(CH_2)_3-(CH_2CH=CH)_2(CH_2)_7COOH$ , которая способна ингибировать депо-

управляемые кальциевые каналы в клетках молочной железы при использовании микромолярных концентраций вещества. Механизм действия связан с подавлением олигомеризации STIM1 и последующего связывания STIM1-Orai1, что происходит, гипотетически, за счет нарушения электростатических взаимодействий между этими белками (Holowka et al., 2014.)

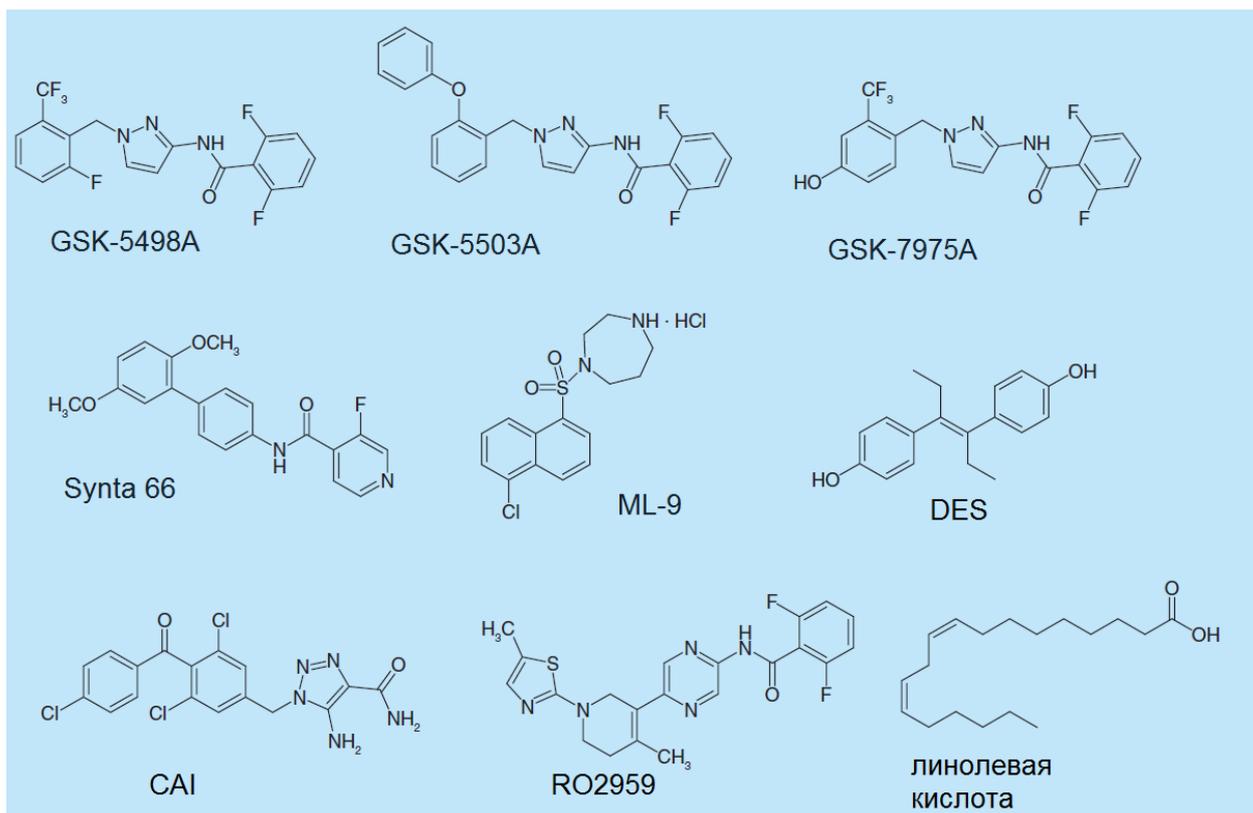


Рисунок 13. Формулы ингибиторов депо-управляемых кальциевых каналов: GSK-5498A, GSK-5503A GSK-7975A; Synta 66; ML-9; диэтилстилбестрол; карбоксиамидотриазол; RO2959; линолевая кислота (цитируется по Tian et al., 2016 с изменениями).

#### 1.10.13. Производные 1-фенил-3-(1-фенилэтил)мочевины.

Недавно была обнаружена серия производных 1-фенил-3-(1-фенилэтил)мочевины (1-phenyl-3-(1-phenylethyl)urea) (Рисунок 14) способные блокировать депо-управляемые кальциевые каналы в микромолярных концентрациях ( $IC_{50} = 3.25 \pm 0.17$  мкМ) в клетках HEK293 с оверэкспрессией белков Orai1 и STIM1 или конститутивно активный Orai1 V102A. При этом

вещества не оказывали влияния на другие каналы Orai. Анализ структуры этих веществ показал важную роль алкильного заместителя в 6 позиции N-фенилэтильной группы в ингибировании активности каналов. Механизм действия данных веществ пока не изучен (Zhang et al., 2015).

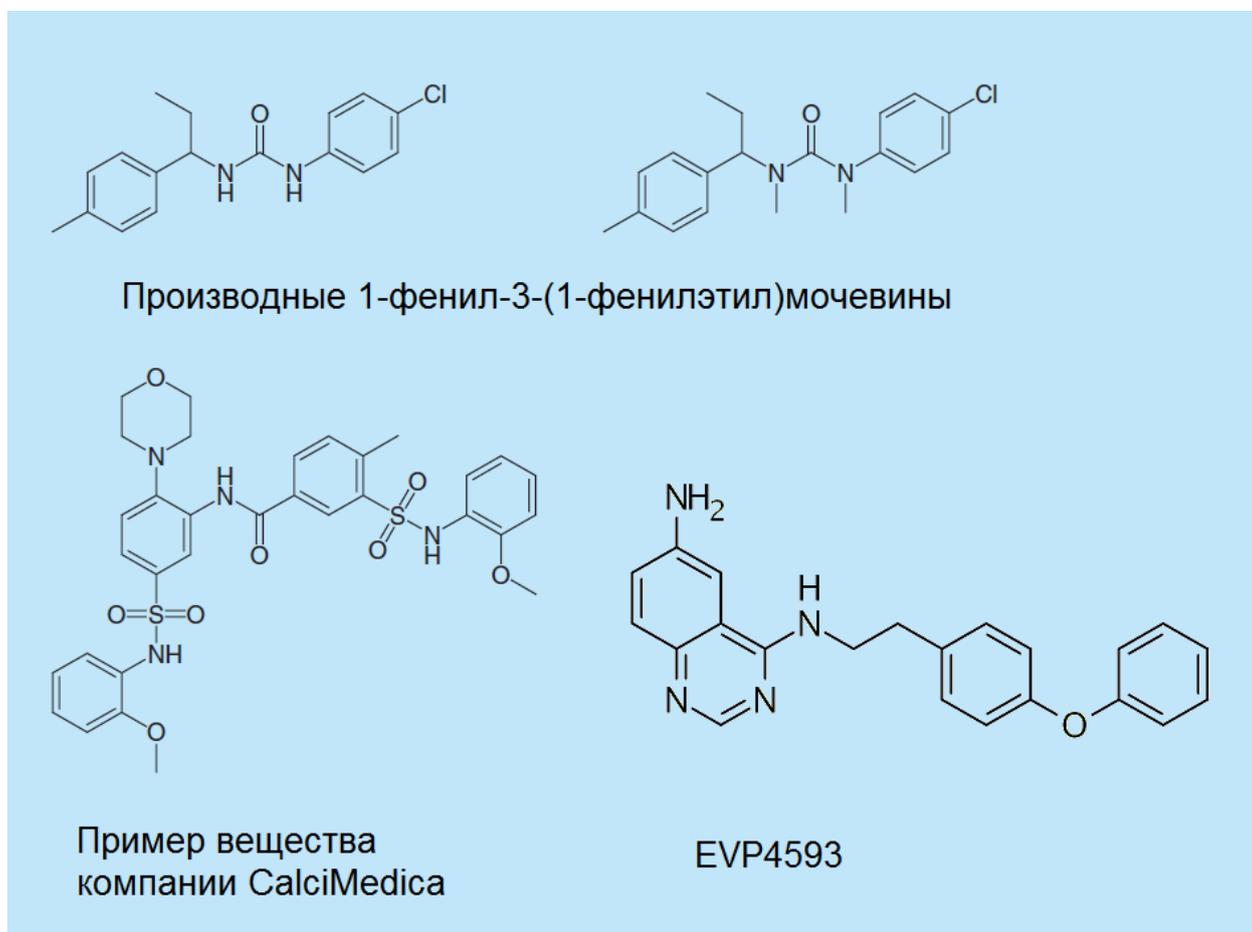


Рисунок 14. Формулы ингибиторов депо-управляемых кальциевых каналов: производные 1-фенил-3-(1-фенилэтил)мочевины, пример запатентованного вещества компании CalciMedica; EVP4593 (цитируется по Tian et al., 2016 с изменениями).

#### 1.10.14. Ингибиторы компании CalciMedica.

Фармакологическая компания CalciMedica активно разрабатывает ингибиторы для депо-управляемых кальциевых каналов. Найденный ими ингибитор CM2489 (Рисунок 14) был предложен в качестве действующего вещества в лекарстве от псориаза и прошел I фазу клинических испытаний. К

сожалению информация о химической формуле вещества является коммерческой тайной. Судя по патенту, опубликованному компанией, новые вещества несут фенильную или гетероциклическую группу соединенную с карбоксиамидом, сульфоксамидом или алькильной цепью (Tian et al., 2016).

#### 1.10.15. EVP4593.

EVP4593 – это вещество, произведенное компанией EnVivo Pharmaceuticals, которое впервые было описано в качестве ингибитора NF-κB пути в клетках Jurkat (Рисунок 14) (Tobe et al., 2003). Было обнаружено, что это вещество подавляет активность депо-управляемых кальциевых каналов в нейронах стриатума и кортикальных нейронах в микромолярных концентрациях (1-3 мкМ) (Wu et al., 2011; Chauvet et al., 2016; Nekrasov et al., 2016). Механизм действия и специфичность данного вещества являются неизученными.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы.

Для культивирования клеток нейробластомы человека использовали среду DMEM (GIBCO BRL, США), сыворотку крови эмбрионов крупного рогатого скота (FBS, GIBCO BRL), пенициллин-стрептомицин (Биолот, Россия). Для культивирования нейронов гиппокампа использовали среду Neurobasal-A и добавку B27 (GIBCO BRL).

В работе также применяли ДМСО, 2-APB, KOH, NaOH, CsCl, BaCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, АТФ-Mg, ГТФ-Na, CsOH, HEPES, тритон X-100, (Sigma, США), EGTA, бычий сывороточный альбумин (BSA) (Fluka, Швейцария), HBSS (GIBCO BRL), PBS (Биолот, Россия), антитела к TRPC4 и Orai1, антитела к  $\alpha$ -тубулину (Sigma), антитела к GOK/STIM1 (BD Biosciences, США), антитела к STIM2 (Cell signaling, США), антитела к TRPC1, Orai2, IP<sub>3</sub>R 1 (Alamone labs, Израиль), Orai3 (ProSci Inc., США), к HA-tag (COVANCE, США), антитела к PS1 CTF и NTF (Millipore Inc., США) и к PS2 (Santa-Cruz, США). Вторичные антитела к IgG мыши и кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma), антитела к IgG крысы, конъюгированные с пероксидазой хрена (Millipore Inc.) и к IgG кролика или мыши, конъюгированные с флуорофором Cy3 (Jackson Immunoresearch, США).

### 2.2. Клетки и трансфекция.

Клетки нейробластомы человека линии Neuro2a (из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН), мышинные фибробласты MEF DKO (клетки MEF с двойным нокаутом генов белков PS1 и PS2, Дюссельдорфский Университет им. Генриха Гейне, Германия), клетки линии HT22 (Дюссельдорфский Университет им. Генриха Гейне, Германия) и клетки линии HEK293T (из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН) культивировали в среде DMEM (GIBCO BRL) с добавлением 5% (Neuro2a, MEF, HT22) и 10% (HEK293T) эмбриональной телячьей

сыворотки (FBS, GIBCO BRL) и антибиотиков (100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина) при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5% CO<sub>2</sub>). За 2 суток до начала эксперимента клетки высевали на фрагменты покровных стёкол (3 мм × 3 мм). Для лучшего прикрепления клеток стекла были обработаны 0,1% поли-L-лизинном. Клетки трансфицировались на второй день после посева. Для трансфекции был использован липидный агент унифектин-56 (ИБХ, Москва). ДНК конструкции, созданные на основе pCDNA3 вектора и содержащие последовательность PS1 дикого типа, PS1 ΔE9 были предоставлены профессором И. Б. Безprozванным (UT Southwestern medical center, США). Для проверки эффективности трансфекции проводилась ко-трансфекция этих ДНК конструкций с вектором pCMS-EGFP, кодирующим последовательность зеленого флуоресцентного белка (GFP), в соотношении примерно 1:3 по массе ДНК векторов. На чашку Петри Ø 2,5 см 70 мкл раствора 10% унифектина-56 в среде DMEM с сывороткой по каплям добавляли в 30 мкл среды, содержащей 1,5 мкг ДНК плазмиды, кодирующей PS1 дикого типа, PS1 ΔE9 и 0,5 мкг ДНК pCMS-EGFP для электрофизиологических исследований. Для исследований на конфокальном микроскопе ДНК плазмиды, кодирующей PS1 дикого типа, PS1 ΔE9 были ко-трансфицированы с вектором pDS, содержащим STIM1-mCherry, в соотношении 2:1. Полученная смесь пипетировали и добавлялась к среде в чашке с клетками. Во всех случаях трансфекция проводилась за 16-18 часов до анализа.

### 2.3. Мыши.

Были использованы мыши линии СЗНА из вивария Института цитологии РАН. Животные содержались в нормальных условиях (комнатная температура, естественное освещение, нормальная смена светового дня) с доступом к пище и воде.

#### 2.4. Получение первичной культуры нейронов гиппокампа.

Мозг декапитированных мышей постнатальной стадии P 0-1 извлекали при температуре 4 °C в стерильном растворе HBSS (на 1 литр: 3,9 г HEPES, 0,84 г NaHCO<sub>3</sub>, 100 мл 10X HBSS, 5 мл раствора гентамицина 10 мг/мл, pH 7,4). Затем в растворе HBSS (4 °C) производили отделение гиппокампа от других тканей мозга с помощью хирургических инструментов. Ткани, полученные от 3-12 мышей, заливали 10 мл раствора для препарирования и центрифугировали при 4 °C на 1000 G в течении 2 минут. После того, как был отобран супернатант, к осадку из клеток добавляли 1,5 мл раствора трипсина (0,1% трипсина, 0,1% ДНКазы I в растворе для препарирования), в котором происходила инкубация в течении 6-7 минут при температуре 37 °C. Трипсин инактивировали 10 мл среды для культивирования нейронов (Neurobasal-A, 1% FBS, 3% B27, 0,6 мг/мл L-Gln) и клетки осаждали центрифугированием при 4 °C на 2000 G в течении 4 минут. После удаления супернатанта к осадку добавляли 500-750 мкл раствора ДНКазы I (0,5% ДНКазы I в растворе для препарирования), клетки прогонялись через носик пипетки путем пипетирования, упирая носик пипетки в дно фалькона, до исчезновения фрагментов ткани. К раствору ДНКазы I с клетками добавляли 10 мл раствора для препарирования и, затем клетки осаждались центрифугированием при 4 °C на 2000 G в течении 4 минут. Супернатант заменяли на 10 мл среды для культивирования и центрифугирование повторялось. После центрифугирования среда заменялась на новую, осадок из клеток пипетировали, далее клетки рассеивали по чашкам Петри с покровными стелами, обработанными 0,01% поли-L-лизинном.

#### 2.5. Получение ленти-вируса и инфицирование нейронов.

Шаттл-векторы, кодирующие PS1 дикого типа или PS1 ΔE9, конъюгированные с HA-tag, IV-1 вектор 8.9 и VSVG плазмиды покровных гликопротеинов для создания ленти-вирусов были предоставлены профессором И. Б. Безпрозванным (UT Southwestern medical center, США).

Шаттл-векторы, несущие направленные или контрольные shRNA, были приобретены в Sigma или OriGene, США. Вирусы производились посредством ко-трансфекции шаттл-векторов с HIV-1 вектором 8.9 ( $\Delta$ 8.9) и VSVG плазмид покровных гликопротеинов в паковую клеточную линию HEK293T. К 1 мл среды без сыворотки добавляли 7,5 мкг шаттл-плазмиды, 6 мкг  $\Delta$ 8.9, 2 мкг VSVG плазмид и 60 мкл трансфецирующего агента PEI (Polysciences Inc, США) и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Полученный 1 мл раствора использовали на чашку Петри  $\varnothing$ 10 см, со свежей средой (для культивирования тех клеток, для инфицирования которых затем будет использован вирус, и 50-70% монослоем клеток HEK293T. После добавления раствора для трансфекции в среду, чашки Петри с клетками инкубировались в термостате в течение 24 часов при температуре 37 °C, а затем 72 часа при температуре 32 °C. За это время упакованные вирусы выделялись клетками в среду. По истечению срока инкубации среда с вирусами была немедленно заморожена в жидком азоте и хранились при -80 °C.

Для определения титра вируса использовался метод иммуноокрашивания с антителами к HA-tag для вирусов, несущих гены белка PS1 дикого типа или мутантный ген белка PS1, и метод проверки устойчивости к пурамицину для вирусов, несущих shRNA. Монослой клеток HEK293T в 24 луночном планшете на покровных стеклах инфицировался с помощью добавления среды с вирусом к среде культивирования в разных соотношениях. Для иммуноокрашивания через 24 часа клетки фиксировали 37% раствором формалина в течение 1 мин при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали в сильно охлажденном метаноле (-20 °C) в течение 1 мин. После однократной отмывки PBS, к клеткам добавляли раствор 10% сыворотки крупного рогатого скота в PBS, в котором они инкубировались в течение 30 мин. К этому раствору добавляли антитела к HA-tag (1:1000) и инкубировали 1 час при комнатной температуре или всю ночь при 4 °C. Отмывка с PBS по 5-10 мин производилась трижды, и к клеткам добавляли вторые антитела к IgG

кролика, конъюгированные с флуорофором Cy3, с которыми они инкубировались в течении 1 часа при комнатной температуре или полчаса при температуре 4 °C в зависимости от протокола производителя. Отмывка с PBS по 5-10 мин производилась трижды. Покровные стекла с клетками накладывали в каплю монтирующей среды для заключения цитологических препаратов (BioVitrum, Россия) на обработанные спиртом предметные стекла. Затем края покровных стекол покрывались прозрачным лаком. Процент инфицированных клеток от числа всех клеток на стекле определяли визуально с помощью флуоресцентного микроскопа Pascal (Zeiss). В результате проверки эффективности инфицирования при измерении процента светящихся клеток, выбирали то соотношение среды с вирусом к среде культивирования, которое давало минимальную эффективность 90%. Вирусы, несущие ген устойчивости к пуромицину, проверялись путем проверки выживаемости клеток в сравнении с контролями (без антибиотика и с летальной дозой антибиотика для неинфицированных клеток) в 24-х луночных планшетах, где к клеткам добавляли разные соотношения вируса и среды, а затем добавляли антибиотик (0,5-10 мкг/мл). Летальная концентрация антибиотика подбиралась экспериментально. Выбирали то количество вируса, которое давало высокую степень выживаемости клеток, количество которых оценивали с помощью камеры Горяева. Инфицирование нейронов происходило на 5 или 7 день в культуре в зависимости от чувствительности клеток к вирусу (shRNA обычно экспрессировали не более 3-х суток, так как более долгая экспрессия приводила к гибели или плохому состоянию клеточной культуры). К клеткам добавляли культуральную среду с количеством ленти-вируса, дающим эффективность трансдукции не менее 90%. На следующий день или через 2 дня после аппликации среды с вирусом, половина среды в чашке с клеточной культурой заменяли на свежую.

## 2.6. Исследование передвижения внутриклеточных белков.

Эксперименты проводились при комнатной температуре (22–25 °C). Для визуализации внутриклеточных флуоресцентных белков в живых клетках были использованы конфокальный микроскоп Zeiss с крутящимся диском, камера AxioCam MRm и программа AxioVision (Carl Zeiss, Германия). Изображения были получены каждые 5 секунд с фиксированного положения Z-stack на центре клетки. Лазерный луч был блокирован между снимками с помощью шаттера (Sutter Instruments, США), чтобы минимизировать негативное воздействие лазера на клетки. Клетки линии Neuro2a были рассеяны на 50-мм чашки со стеклянным дном, имеющим поли-лизиновое покрытие (MatTek Corporation, США). Перед измерением среда, в которой росли клетки, была заменена на HBSS (GIBCO). В течение эксперимента в чашку добавляли тапсигаргин с безкальциевым раствором HBSS (2 мМ EGTA) до финальной концентрации 1 мкМ. Анализ полученных изображений проводили с помощью программы ImageJ (W. S. Rasband, National Institutes of Health, [rsb.info.nih.gov](http://rsb.info.nih.gov)). Анализ был произведен путем подсчета соотношения уровней флуоресценции белка STIM1-Cherry в примембранной области ( $I_{\text{ПМ}}$ ) к цитоплазматической флуоресценции ( $I_{\text{ЦИТ}}$ ) этого белка на сериях изображений одной клетки во времени, что позволяло оценить динамику перемещения белка.

## 2.7. Измерение внутриклеточной динамики кальциевых концентраций.

Клетки были загружены 5 мкМ Fura2-AM (Life Technologies, США) в присутствии 0,025% Pluronic F-127 (Life Technologies) в растворе HBSS (10 мМ HEPES, pH 7,4; 130 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 1,2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,8 мМ CaCl<sub>2</sub>) в течение 50 мин при комнатной температуре. Измерения проводили при смене возбуждающего света с длинами волн 340- и 380-нм с частотой 2 Гц. Эмиссионная флуоресценция измерялась на длине волны 510 нм с помощью программы InCyt Basic I/P (Intracellular Imaging Inc., США). Изменения цитоплазматической концентрации Ca<sup>2+</sup> были измерены как отношение

интенсивностей при 340- и 380-нм возбуждающей длины волны (340/380). Выброс кальция из депо вызывали 1 мкМ тапсигаргина в безкальциевом растворе или опустошение депо осуществляли с помощью 1 мМ ТРЕН в безкальциевом растворе (20 мМ НЕРЕС/КОН, рН 7,3; 130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ EGTA). Депо-управляемый вход кальция был измерен в растворе, содержащем 2 мМ кальция (20 мМ НЕРЕС/КОН, рН 7,3; 130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>). Растворы содержали также 0,01 мМ тетродотоксина и нефедипина.

## 2.8. Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp).

В работе использовали метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации конфигурации «целая клетка» whole-cell. В этой конфигурации происходит разрушение части мембраны, ограниченный пипеткой, что позволяет записывать суммарный ток через все каналы плазматической мембраны. Подачу растворов в экспериментальную камеру производили путем перфузии камеры 3-5 кратным объемом раствора, что обеспечивало полную смену раствора менее чем за 1 с. Эксперименты проводили при комнатной температуре. В конфигурации whole-cell внутрипипеточный раствор содержал (в мМ) 135 CsCl (для нейронов) / 120 CsCl (для Neuro2a) 5 ВАРТА-Cs, 30 Cs-НЕРЕС (рН = 7,3), 5,5 Mg-АТР, and 1,63 CaCl<sub>2</sub> (pCa 7,0) или 120 CsCl, 10 ВАРТА-Cs, 30 Cs-НЕРЕС (рН = 7,3), 5,5 Mg-АТР (pCa < 9). Внеклеточный раствор (раствор экспериментальной камеры) содержал (в мМ): 120 NMDG-Asp, 10 BaCl<sub>2</sub> (0 BaCl<sub>2</sub> для экспериментов с ТРЕН), 10 Cs-НЕРЕС, рН 7,3 с добавлением 0,01 тетродотоксина (tetrodotoxin, Tocris, США), 0,01 нифедипина (nifedipine, Sigma). Сопротивление пипеток после оплавления составляло 4–8 МОм. Во всех опытах whole-cell на мембране поддерживался потенциал, равный -40 мВ. С периодом в 5 с командный (управляющий) потенциал менялся по следующему алгоритму: сначала подавался потенциал -100 мВ в течение 50 мс, затем следовало линейное нарастание потенциала (voltage ramp) от -100 до +100 мВ в течение 500 мс,

после чего потенциал возвращался к  $-40$  мВ. Регистрация токов была проведена с помощью усилителя Axopatch-200B и программного обеспечения pClamp9 (Axon Instruments, США), оцифрована на частоте 5 КГц при помощи Digidata 1332A (Axon Instruments). Интегральные токи нормировались на емкость клетки, которая отражает размер клетки. Среднее значение клеточной емкости для клеток нейробластомы  $19 \pm 4$  пФ ( $n = 75$ ), а для нейронов  $15 \pm 3$  пФ ( $n = 65$ ). Аппликация тапсигаргина осуществлялась с помощью перфузии камеры, конечная концентрация тапсигаргина составляла 1 мкМ. Данные интегрального тока, записанные до подачи тапсигаргина, использовались для вычитания спонтанной активности и утечки для выделения токов, индуцированных аппликацией. Для аппликации 1 мМ ТРЕН был использован внеклеточный раствор без бария, который добавляли в камеру с помощью перфузии, и инкубировали клетки в течение 2 минут, затем меняли раствор на содержащий барий. При анализе интегральные токи, записанные до подачи бария, вычитались для получения чистых значений входящего тока. Для экспериментов с ВАРГА был использован пипеточный раствор, содержащий 10 мМ ВАРГА. Запись токов начинали сразу после перехода в конфигурацию в whole-cell, для анализа использовали вычитание значений интегрального тока со стабильной минимальной амплитудой, развитие тока начиналось в среднем в течение 1 минуты, после прорыва мембраны. Вольтамперные характеристики для токов в ответ на действие активирующих агентов строились для момента времени, когда развитие тока достигало плато вблизи максимальных значений тока. Для анализа записей использовали программное обеспечение Clampfit (pClamp9, Axon Instruments) и Origin 8 (OriginLab, США). Приведенные в тексте данные представлены средними арифметическими значениями величин и их среднеквадратичными отклонениями.

## 2.9. Получение лизатов клеток.

Клетки и тотальные препараты мозга дрозофил, лизировали в течение 10 мин при 4 °С в растворе, содержащем 150 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 2 мМ EDTA, 1% тритон X-100, 1% NP40, 10% глицерин, 0,2 мМ PMSF, с добавлением коктейля ингибиторов протеаз PIC (Roche, Германия). Лизат трижды центрифугировали с ускорением 22000 G при 4 °С в течение 30 мин и отбирали супернатант, который впоследствии использовали в опытах.

## 2.10. Электрофорез белков и иммуноблоттинг.

Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле в вертикальной камере. Разделяющий гель: 0,1% SDS, 0,1% PSA, 0,01% TEMED, Tris-HCl 0,375 М (pH 8,5), раствор акриламида и бис-акриламида (29/1 соответственно) до конечной концентрации 8-12%. Концентрирующий гель: 0,1% SDS, 0,1% PSA, 0,01% TEMED, Tris-HCl 0,133 М (pH 6,8), раствор акриламида и бис-акриламида (29/1 соответственно) до конечной концентрации 5%. К белковым пробам добавляли 4× кратный буфер Tris-HCl (pH 6,8) 200 мМ, β-MeEtOH 400 мМ, SDS 4%, Bromphenol blue 0,1%, Glycerol 40% (до конечной концентрации 1×), полученный раствор инкубировали при температуре 99 °С в течение 5 минут. Затем пробы охлаждали, центрифугировали с ускорением 15000 G 5 минут и наносили в лунки концентрирующего геля. Пока белки находились в концентрирующем геле, в расчете на один гель выставляли ток величиной 25 мА, в разделяющем геле – 60 мА.

Перенос белков на мембрану осуществляли полусухим методом. Нитроцеллюлозную мембрану (Immobilon P, Millipore Inc., США) и гель прежде смачивали в буфере для переноса (TRIS 47,9 мМ, глицин 38,6 мМ, SDS 0,0385%, метанол 20%). Белки массой около 70 кДа переносили в течение часа при токе в 0,8 мА/см<sup>2</sup>.

После переноса мембрану ополаскивали в TTBS (0,1% Tween, 10 мМ TRIS, 150 мМ NaCl, pH=7,6), и забивали на ней места неспецифической

сорбции белков 10% обезжиренным молоком, растворенным в TTBS. Для антител Orai1 и STIM2 забивка производилась с 5% молоком и 5% BSA. Мембрану инкубировали с первыми антителами один час при комнатной температуре или всю ночь при 4 °C. Антитела разводили в TTBS, для антител Orai1 (Sigma, США) и STIM2 (Cell Signaling, США) к раствору добавлялось 5% BSA. Использовалась концентрация антител, указанная в прописях фирмы-производителя. После инкубации с первыми антителами мембрану отмывали 3 раза по 10 минут в TTBS. Вторые антитела против мышинных или крысиных IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma), в 10% молоке добавляли на один час при комнатной температуре. Отмывка производилась 3 раза по 10 минут в TTBS. Мембрану проявляли SuperSignal Chemiluminescent Substrate (Pierce, США). Положение белков отслеживали с помощью фотопленки. Были использованы поликлональные и моноклональные антитела для Orai1 (Sigma), поликлональные антитела для Orai2 (Alomone Labs, Израиль), TRPC1 (Alomone Labs), STIM2 (Alomone Labs или Cell Signaling, США), моноклональные антитела против STIM1 (BD Transduction Laboratories, США) и против PS1 CTF или PS1 NTF (Millipore Inc.). Анти- $\alpha$ -тубулин моноклональные антитела (Sigma) были использованы для проверки одинакового уровня белка в нанесенных на мембрану пробах. Все антитела использовались согласно инструкциям производителей.

#### 2.11. Ко-иммунопреципитация.

Для экспериментов с ко-иммунопреципитацией эндогенных белков STIM1 и Orai1, клетки линии Neuro2a были инкубированы в течении 8 минут с раствором HBSS или с безкальциевым раствором (0 Ca) с добавлением 1 мкМ тапсигаргина и затем были лизированы в буфере (20 мМ Tris-HCl (pH 7,6), 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 1 мМ EDTA, 1 мМ EGTA, 0,5 мМ phenylmethylsulfonyl fluoride и ингибиторами протеаз. После инкубации в течение 10 минут на льду и центрифугирования на скорости 20000 G в течение 5 минут и при температуре 4 °C, очищенные лизаты были преинкубированы с

30 мкл промытой G-Сефарозы (Sigma) в течение 3 часов и  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Сефарозные шарики затем были осаждены центрифугированием (20000 G, 5 мин,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Очищенные лизаты были затем инкубированы в течение ночи при  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  на вращающейся платформе с 3 мкг антител (анти-STIM1, BD Transduction Laboratories, анти-Orai1, Sigma), и затем 30 мкл промытой G-Сефарозы были добавлены к лизатам, и инкубация продолжена еще 3 часа на вращающейся платформе при  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Затем сефарозные шарики были дважды осаждены центрифугированием и промыты. Элюирование осуществлялось с в раствор 5× буфера Лэммли (Laemmli Buffer). Пробы были разделены на 10% SDS-полиакриламидном геле и проанализированы с помощью иммуноблоттинга. Блоты, полученные в трех независимых экспериментах, затем были проанализированы с помощью программы ImageJ (W.S. Rasband, National Institutes of Health; [rsb.info.nih.gov](http://rsb.info.nih.gov)). Все денситометрические показатели были нормализованы на пробы контрольных клеток, экспрессирующих PS1 дикого типа, инкубированные в HBSS.

2.12. Клонирование последовательности человеческого гена белка PS1 в вектор pUAST.

Последовательности гена человека белка PS1 (дикого типа и с мутацией) была переклонирована в вектор pUAST rc (Brand et al., 1993) (Рисунок 15, А) из ленти-вирусных плазмид, использованных для экспериментов с клеточными культурами. Были использованы праймеры: прямой 5' AAGAATTCATGGCGTACCCATACG 3' (сайт EcoRI) и обратный 5' TTCTCGAGCTAGATATAAAATTGA 3' (сайт XhoI). Для получения достаточного количества вставки была использована ПЦР с полимеразой Pfu polymerase (ThermoFisher, США). Объем реакции был 50 мкл, и состав реакции соответствовал протоколу производителя. ПЦР осуществляли по следующему алгоритму:  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  – 3 мин; 40 циклов по  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 сек,  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  30 сек,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  2 сек;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 мин;  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  бесконечно. Реакционную смесь затем разделяли в 0,8% агарозном геле и вырезали участок геля с ДНК соответствующей вставке

(Рисунок 15, Б). ДНК вставки очищали из геля при помощи набора Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя. Далее для вектора pUAST gc и ДНК вставки было осуществлено двойное разрезание (double digest) в реакции рестрикции при помощи рестриктаз XhoI и EcoRI (Fermentas, ThermoFisher, США) согласно протоколу производителя. Реакция была инактивирована при помощи инкубации на 65 °C в течении 20 минут. Затем вектор pUAST обрабатывали щелочной фосфатазой (New England Biolab, США) и реакция была инактивирована инкубацией при 70 °C в течение 5 минут. Лигирование проводили с помощью ligase T4 (New England Biolab) согласно протоколу производителя, а затем реакция была инактивирована при температуре 65 °C в течение 10 минут. Лигированную ДНК использовали для трансформации бактериальных клеток DH5α™ Competent Cells (ThermoFisher) согласно протоколу производителя, и клетки были рассеяны на чашки с агарозной питательной средой с антибиотиком. В качестве контроля для трансформации использовали реакцию рестрикции с вектором. Полученные колонии затем отбирали, получали культуру в среде LB (Sigma) с антибиотиком, из которой выделяли ДНК с помощью набора для maxi-prep (Qiagen, США). Результат лигирования проверяли с помощью рестрикции по EcoRI и XhoI, а также ПЦР с праймерами к PS1 (см. в тексте выше) (Рисунок 15, В).

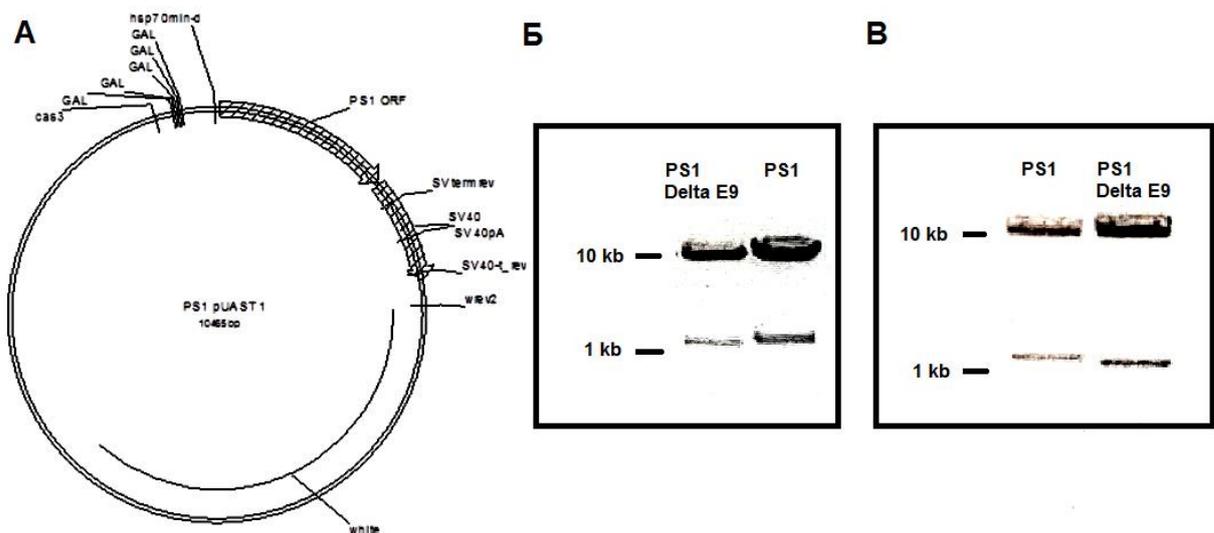


Рисунок 15. Клонирование последовательности человеческого гена белка *PS1* в вектор *pUAST1* *rc*. А. Карта вектора *pUAST1* *rc* со вставкой последовательности человеческого гена белка *PS1* под контролем промотера *GAL4* (подробнее в тексте). Б. Результаты ПЦР для получения вставки, визуализированные на 0,8% агарозном геле. В. Результаты рестрикции по сайтам *XhoI* и *EcoRI* векторов *pUAST1* *rc* со вставкой последовательности человеческого гена белка *PS1* дикого типа и с делецией 9-го экзона (*PS1 Delta E9*), визуализированные на 0,8% агарозном геле.

### 2.13. Создание трансгенных линий дрозофил.

Для создания трансгенной модели БА на основе *Drosophila melanogaster* ДНК конструкция (*pUAST rc*) и Р-элемент с дефектными инвертированными повторами, использованный как источник транспозазы, P25.7<sub>wc</sub> (Karess and Rubin, 1984), инъецировались в линию  $y^1w^{1118}$  на стадии пребластодермального эмбриона, как описано в (Rubin and Spradling, 1982; Spradling and Rubin, 1982). (Плазмиды и линии мух – подарок проф., акад. П.Г. Георгиева, ИБГ РАН). Выжившие мухи были скрещены с линией  $y^1w^{1118}$ . Трансгенных мух отбирали на основе фенотипического проявления экспрессии генов *mini-white* (красные глаза). Вектор *pUAST rc* содержит индуцибельный промотор – 5 сайтов связывания дрожжевого белка-активатора *GAL4* (*UAS*) находятся в непосредственной близости от корового участка промотора *Hsp70* (-43 +204

относительно старта транскрипции) и маркерный ген *white*. Вектор фланкирован концами Р-элемента для встраивания в геном. Полученные трансгены выведены в гомозиготное состояние путем последовательных скрещиваний с мухами-балансерами с балансерными хромосомами, несущими запиратели кроссинговера по второй или третьей хромосоме, имеющими фенотипический маркер (укороченная длина щетинок или загнутые крылья). Полученные гомозиготные трансгены (далее в тексте трансгены с мутантным геном обозначены как UAS-PS1 ΔE9) скрещены с трансгенной линией:  $w[*]; P\{w[+mC]=Cha-GAL4.7.4\}19B$   $P\{w[+mC]=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF[T2]$  (FlyBase, Bloomington Drosophila Stock Center, США) (далее в тексте обозначена как Cha-GAL4), имеющей вставку промотера холинэстеразы, специфического для холинэргических нейронов, контролирующего экспрессию транскрипционного фактора GAL и вставку, кодирующую флуоресцентный белок GFP под контролем промотера UAS. Все скрещивания и генетический анализ линий *Drosophila melanogaster* проводили при температуре 25 °C на стандартной питательной среде: агар, дрожжи, сахар. Скрещивания проводились в стандартных стеклянных пробирках, на одну пробирку брали 2-3 самца и 10-15 самок (Lindsley and Zimm, 1992).

#### 2.14. Линии *Drosophila melanogaster*, использованные в данной работе.

Обозначения аллелей даны согласно принятой символике (Lindsley and Zimm, 1992).

Линии *Drosophila melanogaster*:

Canton-S - лабораторная линия дикого типа.

$y^1w^{1118}$  - лабораторная линия, несущая мутацию гена *yellow* с нарушенным инициаторным кодоном и мутацию гена *white*, представляющую собой делецию значительной его части.

$y^1w^{1118}; SM5/+$  - лабораторная линия с балансерной хромосомой, несущая запиратели кроссинговера по второй хромосоме (доминантные маркеры

*In(2RL),CyO*). Использовалась для определения хромосомы, на которой произошло встраивание конструкции.

$y^1w^{1118}; TM3/+$  - лабораторная линия с балансерной хромосомой, несущая запиратели кроссинговера по третьей хромосоме (доминантные маркеры *In(3LR)TM3,Sb*). Использовалась для определения хромосомы, на которой произошло встраивание конструкции.

$w[*]; P\{w[+mC]=Cha-GAL4.7.4\}19B \quad P\{w[+mC]=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF[T2]$  - линия, источник GAL4-активатора дрожжей, содержащая также вставку гена GFP под контролем UAS (Salvaterra et al., 2001).

## 2.15. Фенотипический анализ экспрессии генов *mini-white* в трансгенных линиях.

Ген *white* отвечает за пигментацию глаз, в геноме он находится под контролем тканеспецифичного энхансера, обеспечивающего высокую экспрессию гена *white* в глазах мух (Pirrotta et al., 1985). Уровень экспрессии гена *white* легко оценивать фенотипически по пигментации глаз. Пигментация глаз, зависящая от уровня экспрессии гена *white*, оценивается по следующей шкале: Кр – красный; тКор – темно-коричневый; Кор – коричневый; тОр – темно-оранжевый; Ор – оранжевый; тЖ – темно-желтый; Ж – желтый; сЖ – светло-желтый, Б – белый. Красная окраска соответствует пигментации глаз мух дикого типа (энхансер-зависимая экспрессия гена *white*); желтая и темно-желтая окраски представляют собой средне-статистическое проявление базовой пигментации (экспрессия гена *white* в отсутствие энхансера), белая окраска глаз наблюдается в отсутствие пигментации (у мух с инактивированным геном *white*), остальные окраски глаз соответствуют промежуточным уровням экспрессии гена *white* (Рисунок 16).

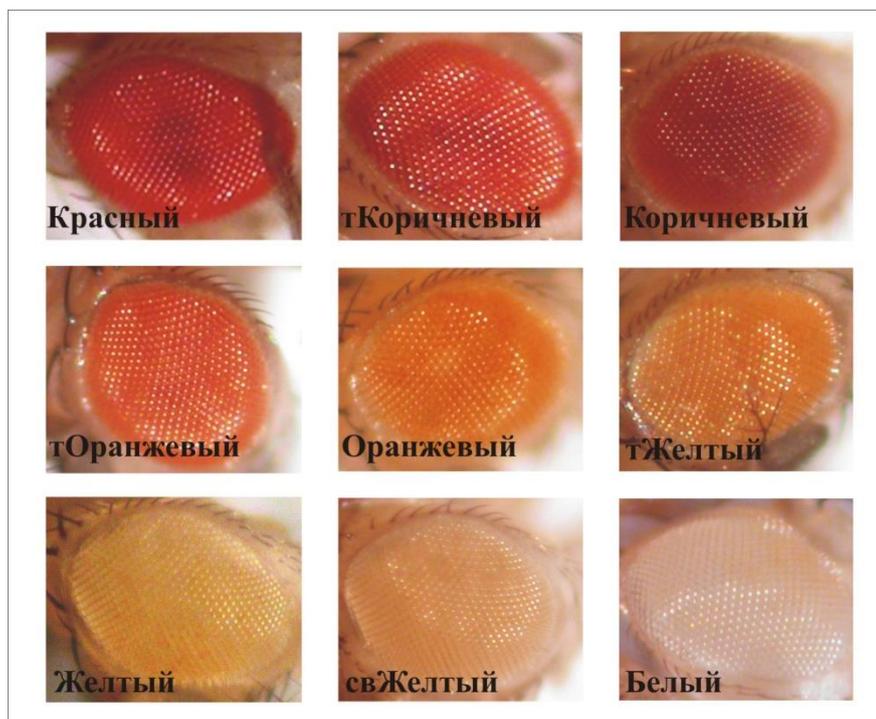


Рисунок 16. Пигментация глаз, зависящая от уровня экспрессии гена *white*. Объяснения в тексте.

Для анализа фенотипов трансгенных мух использовали самцов в возрасте 3-5 дней после вылупления, результаты сравнивали с контрольными мухами с известным фенотипом. Эффекты тестируемых элементов на экспрессию генов оценивались сравнением фенотипов мух, несущих исходную конструкцию с фенотипами производных линий этой конструкции, содержащих делецию тестируемого элемента.

## 2.16. Генетические скрещивания.

Определение хромосомы, на которой находится встроенная в геном конструкция:

Для определения хромосомы, на которую произошло встраивание конструкций, использовались следующие линии мух:

$y^1w^{1118}; SM5/+$  - лабораторная линия с балансерной хромосомой, несущая запиратели кроссинговера по второй хромосоме (доминантные маркеры *In(2RL), CyO*). Фенотипически маркер *CyO* проявляется в загнутых крыльях.

$y^l w^{1118}; TM3/+$  - лабораторная линия с балансерной хромосомой, несущая запиратели кроссинговера по третьей хромосоме (доминантные маркеры  $In(3LR)TM3, Sb$ ). Фенотипически маркер  $Sb$  проявляется в укороченных щетинках.

При последовательном скрещивании сначала с линией  $y^l w^{1118}; SM5/+$ , в следующем поколении с линией  $y^l w^{1118}; TM3/+$ , в зависимости от того, на какой хромосоме находилась встроенная в геном конструкция, получаются разные фенотипы мух.

1) Если конструкция ( $K$ ) находится на X хромосоме:

F0: ♂  $y^l w^{1118} K; +; +$  × ♀  $y^l w^{1118}; SM5/+; +$

F1: ♀  $y^l w^{1118} K; +; +$

♀  $y^l w^{1118} K; SM5/+; +$

Обозначены только фенотипы мух, несущих конструкцию.

В поколении F1 все мухи, несущие конструкцию, будут самками.

2) Если конструкция ( $K$ ) находится на второй хромосоме:

F0: ♂  $y^l w^{1118}; K/+; +$  × ♀  $y^l w^{1118}; SM5/+; +$

F1: ♂  $y^l w^{1118}; SM5/K; +$  × ♀  $y^l w^{1118}; +; TM3/+$

F2: ♂  $y^l w^{1118}; K/+; TM3/+$

♀  $y^l w^{1118}; K/+; TM3/+$

♂  $y^l w^{1118}; K/+; +$

♀  $y^l w^{1118}; K/+; +$

Обозначены только фенотипы мух, несущих конструкцию.

В поколении F2 у мух, несущих конструкцию, не будет балансера  $SM5$ .

2) Если конструкция ( $K$ ) находится на третьей хромосоме:

F0: ♂  $y^l w^{1118}; +; K/+$  × ♀  $y^l w^{1118}; SM5/+; +$

F1: ♂  $y^l w^{1118}; SM5/+; K/+$  × ♀  $y^l w^{1118}; +; TM3/+$

F2: ♂  $y^l w^{1118}; SM5/+; TM3/K$

♀  $y^l w^{1118}; SM5/+; TM3/K$

♂  $y^l w^{1118}; +; TM3/K$

♀  $y^l w^{1118}; +; TM3/K$

♂  $y^lw^{1118}; SM5/+; K/+$

♀  $y^lw^{1118}; SM5/+; K/+$

♂  $y^lw^{1118}; +; K/+$

♀  $y^lw^{1118}; +; K/+$

Обозначены только фенотипы мух, несущих конструкцию.

В поколении F2 среди мух, несущих конструкцию, будут мухи с балансером *SM5*.

#### 2.17. Условия содержания дрозофил.

Насекомых содержали на стандартном пищевом субстрате (агар, манная крупа, сахар, изюм, дрожжи) в специальных пластиковых стаканчиках (высота 95 мм, диаметр 25 мм). Поддерживали 12-часовой световой день, температуру 25 °С и влажность ≈65%. Все эксперименты проводили в одинаковых условиях в одно и то же время с 10 до 18 часов. Экспериментальных насекомых собирали аспиратором в течение 5 часов после вылупления и содержали поодиночке или в группе до достижения ими необходимого возраста.

#### 2.18. Регистрация поведения ухаживания.

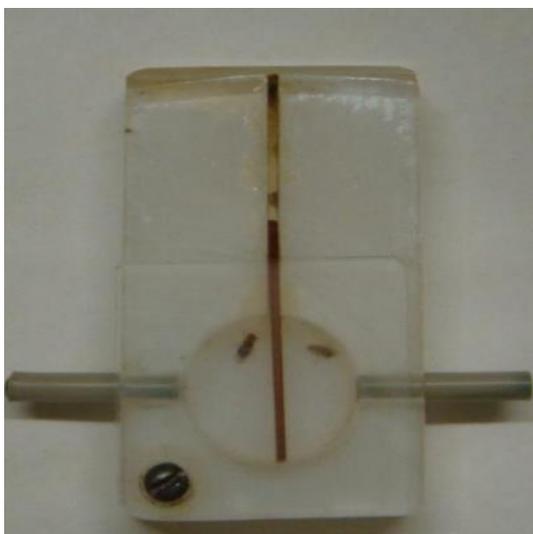
Самцы, использованные в экспериментах, были собраны сразу же после вылупления и помещены в индивидуальные плексиглазовые емкости (диаметр – 25 мм, высота – 195 мм) до достижения возраста для эксперимента (5 и 21 день). Для получения оплодотворённых самок Canton-S, используемых в качестве объекта ухаживания, использовали незрелых мух. За сутки до опыта, самок ссаживали с самцами Canton-S, собранными и содержащимися аналогичным образом по 25 особей на стаканчик, для копуляции, которая приводила к временной потере способности к повторному спариванию (нерецептивности). Оплодотворенных самок отделяли от группы непосредственно перед помещением в экспериментальную камеру с помощью аспиратора. Стандартная методика тестирования поведения ухаживания самцов дрозофилы подразумевает использование стандартной

экспериментальной камеры из оргстекла (диаметр – 15 мм, высота – 5 мм), имеющей разделяющую ее пополам перегородку (Рис. 17). Самца с помощью aspirатора помещали в одну половину камеры, самку – в другую, и через 45 секунд заслонку отодвигали и начинали тестирование. Этограмму поведения самца регистрировали в течение 300 секунд, фиксируя время начала отдельных элементов ухаживания (ориентация, вибрация, лапанье, лизание, попытка копуляции), а также элементов, не связанных с ухаживанием (побежка, прининг, покой). Для регистрации и анализа данных использовали программу «Drosophila Courtship» (автор Н. Г. Камышев). Данная программа позволяет измерить процент времени, занятого отдельными элементами поведения или их сочетаниями, а также их длительность (в секундах) и частоту (в пересчёте на 100 секунд). Кроме этого, она вычисляет процент времени (индекс ухаживания, ИУ), частоту и длительность занятые всеми элементами ухаживания. ИУ находится по следующей формуле:

$$ИУ = \frac{t_{ух}}{t_{общ}} \times 100\%,$$

где  $t_{ух}$  - время, занятое ухаживанием,  $t_{общ}$  - общее время наблюдения.

В качестве показателя двигательной активности при тестировании поведения ухаживания использовали параметры побежки: время, занятое побежкой (индекс активности, %), частоту инициации побежки (в пересчете на 100 секунд) и ее длительность (секунды).



*Рисунок 17. Камера для регистрации поведения для определения ИУ (индекса ухаживания). Подробное объяснение в тексте.*

## 2.19. Кормление дрозофил питательной смесью с 2-АРВ.

2-АРВ (Sigma) растворяли в ДМСО до концентрации 100 мМ. ДМСО или раствор 2-АРВ добавляли в дрожжевую питательную среду в соотношении 1:250, и распределяли ее кисточкой по поверхности стандартной смеси. Конечная концентрация для 2-АРВ была 400 мкМ, для ДМСО – 0,4%. Мух перемещали в емкости с едой и фармакологическими веществами на 13-й день после вылупления, а затем каждый день в течение 7 дней. На седьмой день (один день до измерения ИУ) самцов перемещали в емкости со стандартным питанием, чтобы избежать присутствия запаха от веществ. Для регистрации ИУ в контрольной группе самцы помещались в камеру одни на 1 час, или, если производилось обучение (экспериментальная группа), их помещали на 1 час вместе с 5-ти дневной нерцептивной (оплодотворенной) самкой Canton-S. Самцы после обучения или самцы из контрольной группы через час помещались в чистую камеру с другой нерцептивной самкой для измерения ИУ. ИУ был измерен для каждого самца в отдельности (Siegel et al., 1979; Hall, 1994; Kamyshev et al., 1999). Данные были проанализированы с помощью теста на рандомизацию (Sokal and Rolf, 1995). Данные на картинках представлены как среднее со стандартной ошибкой среднего, значимость обозначена для  $p$ : \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$  и \*\*\* $<0.001$ .

## 2.20. Статистический анализ.

Данные представлены как среднее и стандартная ошибка среднего. Анализ с использованием one-way ANOVA был использован для электрофизиологических данных и данных для измерений внутриклеточной концентрации кальция. Student's  $t$  test был использован для иммуноблотов и данных полученных с помощью конфокальной микроскопии. Для анализа использовали программное обеспечение Origin8 (OriginLab, США). Значимыми считались различия при  $p$ : \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$  и \*\*\* $<0.001$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое ухудшает память и обучение, выборочно влияя на определенные группы нейронов, главным образом в гиппокампе и коре головного мозга. Мутации в гене белка пресенилин-1 (PS1) составляют около 50% мутаций, приводящих к развитию наследственной формы БА (НБА), что указывает на важность PS1 в патогенезе заболевания (Bekris et al., 2010). PS1 подвергается эндопротеолитическому разрезанию с образованием N- и C-концевых фрагментов (NTF и CTF). Эти фрагменты связываются друг с другом, образуя ферментативно активную форму PS1, которая функционирует как каталитическая субъединица комплекса  $\gamma$ -секретазы, состоящей из PS1 и белков Nicastrin, Aph-1 и PEN-2 (Bekris et al., 2010; Behr et al., 2001). Комплекс PS1/ $\gamma$ -секретазы последовательно расщепляет трансмембранный белок-предшественник амилоида (APP) с образованием пептида A $\beta$ . Было показано, что мутации, связанные с НБА, в гене белка PS1 изменяют расщепление APP в пользу продуцирования нейротоксического пептида A $\beta$ 42 (Bekris et al., 2010). Существует также множество свидетельств того, что мутации в гене белка PS1 нарушают регуляцию внутриклеточного кальциевого гомеостаза, в частности в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) (Tu et al., 2006; Cheung et al., 2008; Green et al., 2008). Rybalchenko et al., 2008; Payne et al., 2010; Jin et al., 2010; Ryazantseva et al., 2013; Honarnejad et al., 2013; Sepulveda-Falla et al., 2014). Полноразмерный PS1 имеет размер около 50 кДа и в основном расположен на мембране ЭР, а также на плазматической мембране. Ранее повышенный уровень 50 кДа PS1, вызванный отсутствием или снижением эндопротеолиза, был обнаружен в тканях мозга пациентов с НБА, имеющих мутации в гене белка PS1. Кроме того, было показано, что повышенный уровень полноразмерного PS1 влияет на уровень выброса кальция из ЭР в клетках НЕК (Honarnejad et al., 2013). Точный молекулярный механизм того, как мутации в

гене белка PS1 вызывают нарушения кальциевого гомеостаза в ЭР, полностью не разрешен. Было предложено, что неразрезанная полноразмерная форма PS1 может образовывать канал пассивной утечки кальция в мембране ЭР (Tu et al., 2006), регулировать активность рецептора к индозитол-1,4,5-трисфосфату (IP3R) (Cheung et al., 2008) и рианодинового рецептора (RyR) (Rybalchenko et al., 2008; Payne et al., 2010); взаимодействовать с насосом кальциевой АТФ-азы сарко/эндоплазматического ретикулума (SERCA), которая активно переносит кальций из цитоплазмы в ЭР, и регулировать ее функцию (Green et al., 2008; Jin et al., 2010). Очевидно, что дисбаланс кальция в ЭР, вызванный PS1, может привести и к другим нарушениям в гомеостазе кальция. В частности, зависимые от депо кальциевые каналы в плазматической мембране, такие как депо-управляемые кальциевые каналы и потенциал-управляемые кальциевые каналы T- и L-типа (Harraz et al., 2014), могут быть затронуты дисбалансом кальция в ЭР. Депо-управляемые каналы опосредуют вход кальция в клетку в ответ на снижение концентрации кальция в просвете ЭР (депо-управляемый кальциевый вход). Активация депо-управляемых каналов управляется двумя сенсорами кальция, локализованными в мембране ЭР: белки STIM1 и STIM2, которые передают сигнал к каналам на плазматической мембране (ПМ) (Brandman et al., 2007). Активность депо-управляемых каналов необходима для реализации основных процессов в нейронах, включая долгосрочную потенциацию (LTP) и высвобождение нейротрансмиттера (Emptage et al., 2001; Baba et al., 2003; Majewski et al., 2015). Таким образом, существует возможность, что накопление полноразмерного белка PS1, в результате подавления эндопротеолиза, происходящее при патологических изменениях в мозге у пациентов с НБА, может приводить к нарушениям в активности депо-управляемых кальциевых каналов в нейронах, и, как следствие, к нарушениям происходящих в них базовых процессов.

### 3.1. Фармакологическое ингибирование эндопротеолиза PS1 влияет на депо-управляемый вход кальция в клетках Neuro2a.

Повышение уровня неразрезанного белка PS1 (50 кДа) было обнаружено в посмертных препаратах мозга пациентов, страдавших наследственной формой БА, связанной с мутациями в гене белка PS1 (Honarnejad et al., 2013). Повышенный уровень белка PS1 и уровень его мРНК также были обнаружены в мозговой ткани пациентов со спорадической формой БА (Borghi et al., 2010).

Было показано, что ослабление уровня эндопротеолиза и накопление полноразмерного PS1 приводят к значительному снижению выброса кальция из ЭР в ответ на аппликацию тапсигаргина, вызывающего пассивное опустошение кальциевых депо (Tg, необратимый ингибитор кальциевых помп SERCA), в клетках НЕК293 (Honarnejad et al., 2013). Для моделирования повышения уровня полноразмерного PS1 были использованы клетки нейробластомы мыши Neuro2a, в которых подавление эндопротеолиза PS1 было вызвано фармакологическим ингибированием ферментативной активности PS1/ $\gamma$ -секретазы. После 18-часовой инкубации клеток с мощным ингибитором  $\gamma$ -секретазы L-658,458 (Sigma) (Behr et al., 2001) (7 мкМ в 0,1% ДМСО) уровень полноразмерного PS1 (50 кДа) в них значительно увеличился по сравнению с контрольными клетками (без обработки) и клетками, инкубированными только с 0,1% ДМСО (Рисунок 18, А). Измерение динамики внутриклеточной концентрации кальция с помощью Fura-2 выявило приблизительно 10% снижение выброса  $Ca^{2+}$  в ответ на пассивное опустошение кальциевых депо с помощью 1 мкМ Tg в клетках, инкубированных с L-658,458, что подтверждает ранее опубликованные данные в Honarnejad et al., 2013 (Рисунок 18, В). В тоже время депо-управляемый вход кальция был значительно повышен в клетках Neuro2a, где эндопротеолиз PS1 был фармакологически ингибирован с L-658,458 (Рисунок 18, Б, Г). Таким образом, можно сделать вывод, что ослабленный эндопротеолиз белка PS1 влияет на уровень депо-управляемого входа кальция

в клетки, и повышение уровня неразрезанного PS1 способствует более высокому уровню входа кальция.

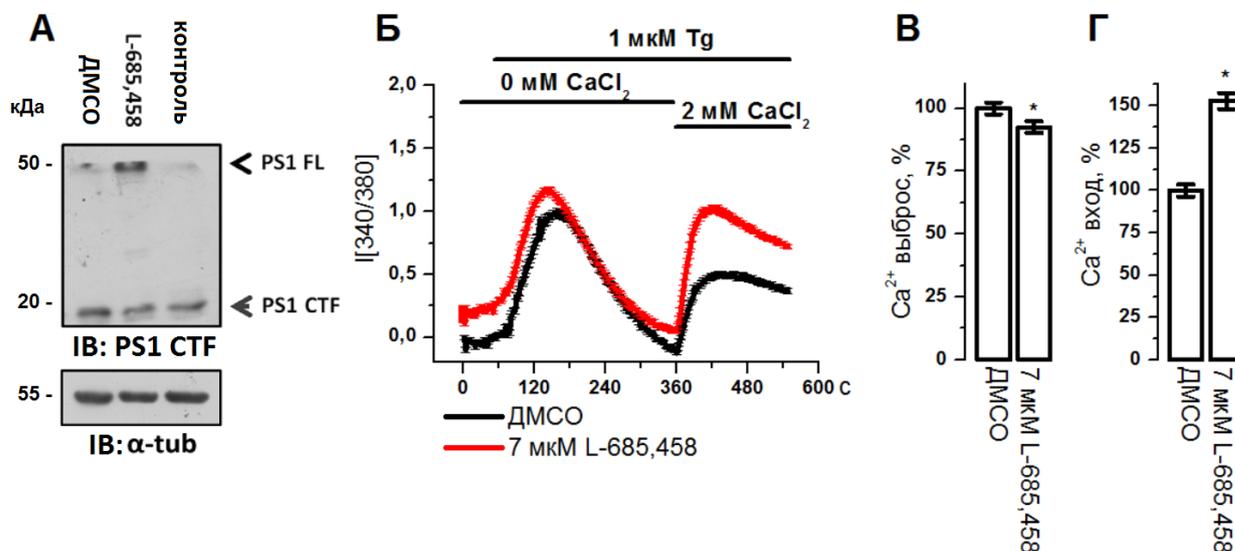


Рисунок 18. Подавление эндпротеолиза PS1 в клетках Neuro2a приводит к увеличению депо-управляемого кальциевого входа. Клетки Neuro2a инкубировали в течение 18 часов с 7 мкМ L-658,458 или 0,1% ДМСО, в качестве контроля использовали необработанные клетки. А. Иммуноблоттинг лизатов Neuro2a с моноклональными антителами к PS1 CTF (С-терминальный фрагмент). Уровень белка контролировался иммуноблоттингом с моноклональными антителами к  $\alpha$ -тубулину. Б. Эксперименты по измерению динамики внутриклеточной концентрации кальция. (0 Ca – безкальциевый раствор, Tg – тапсигаргин). Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ,  $n = 95-112$ ). В, Г. Уровень выброса Ca<sup>2+</sup> из Tg-чувствительных депо (В) и уровень депо-управляемого входа (Г), выраженные в процентах от среднего уровня в клетках, обработанных ДМСО. Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ,  $n = 95-112$ ).

3.2. Увеличение уровня полноразмерного белка PS1 при экспрессии неактивного PS1 D257A в клетках мышинных фибробластов MEF с двойным нокаутом генов белков PS1 и PS2 усиливает депо-управляемый вход кальция.

Для того, чтобы подтвердить влияние ослабленного эндопротеолиза на депо-управляемый вход кальция, мутантный ген белка PS1, в котором замена ключевого аспартата D257A приводит к полной потере эндопротеолитической активности, был экспрессирован в клетках MEF ДКО с двойным нокаутом генов белков PS1 и PS2. Белок с заменой PS1 D257A, который не подвергается эндопротеолизу (Brunkan et al., 2005), был обнаружен в клеточных лизатах в виде белка около 50 кДа, тогда как PS1 дикого типа подвергался нормальному эндопротеолизу и образовывал две полосы около 50 и 17 кДа (полноразмерный белок и С-терминальный фрагмент) на иммуноблоте (Рисунок 19, А). Эксперименты с измерением динамики внутриклеточной концентрации кальция показали значительное усиление депо-управляемого входа кальция в клетках ДКО, экспрессирующих мутантный ген белка PS1, по сравнению с контрольными клетками ДКО и ДКО, экспрессирующими ген белка PS1 дикого типа (Рисунок 19, Б). Принимая во внимание, что клетки ДКО не обладают активной  $\gamma$ -секретазой из-за отсутствия обоих белков PS, образующих каталитический центр фермента  $\gamma$ -секретазы, и то, что PS1 D257A не способен к ферментативной активности, можно заключить, что увеличение уровня полноразмерного PS1 влияет на депо-управляемый вход кальция независимо от производства  $A\beta$  и, кроме того, независимо от PS2. Чтобы проверить, что сам ингибитор  $\gamma$ -секретазы не оказывает влияние на вход кальция, был проведен эксперимент по обработке клеток ДКО с L-658,458. В результате эксперимента с клетками, инкубированными в течение 18 часов с L-658,458 или только с ДМСО не было обнаружено различий в уровне входа кальция в ответ на опустошение депо с Tg (Рисунок 19, В).

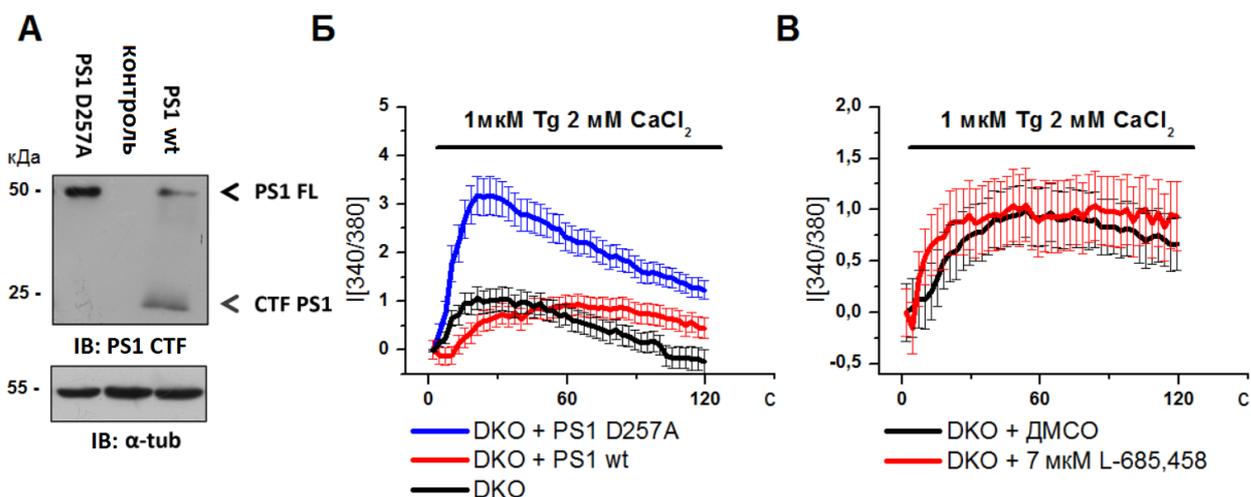


Рисунок 19. Увеличение уровня полноразмерного белка PS1 при экспрессии неактивного PS1 D257A в клетках мышинных фибробластов MEF с двойным нокаутом генов белков PS1 и PS2 (DKO) усиливает депо-управляемый вход кальция. А. Иммуноблоттинг лизатов MEF DKO, экспрессирующих PS1 дикого типа (PS1 wt), PS1 D257A, или контрольных клеток с моноклональными антителами к PS1 CTF. Уровень белка контролировался иммуноблоттингом с моноклональными антителами к α-тубулину. Б. Эксперименты по измерению динамики внутриклеточной концентрации кальция с клетками MEF DKO, экспрессирующих PS1 дикого типа (PS1 wt), PS1 D257A, или контрольных клеток (Tg – тапсигаргин). Данные показаны как среднее ± SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 63-75$ ). В. Эксперименты по измерению динамики внутриклеточной концентрации кальция с клетками MEF DKO, инкубированных в течение 18 часов с 7 мкМ L-658,458 или 0,1% ДМСО. Данные показаны как среднее ± SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 54-57$ ).

3.3. Подавление эндопротеолиза PS1 вызывает усиление активации депо-управляемых кальциевых каналов клетках Neuro2a.

Для оценки влияния подавления эндопротеолиза PS1 на токи депо-управляемых каналов ( $I_{SOC}$ ; Store-Operated Calcium Current) были проведены серии электрофизиологических экспериментов. На первом этапе клетки Neuro2a инкубировали в течение 18 часов с 7 мкМ L-658,458 или 0,1% ДМСО, а затем уровень эндопротеолиза оценивали путем иммуноблоттинга клеточных лизатов с антителами к С-терминальным фрагментам (CTF) PS1.

Данные денсиметрических измерений на иммуноблотах были затем выражены как отношение уровня полноразмерного PS1 к уровню его концевому фрагмента, чтобы оценить уровень эндопротеолиза (Рисунок 20, А).

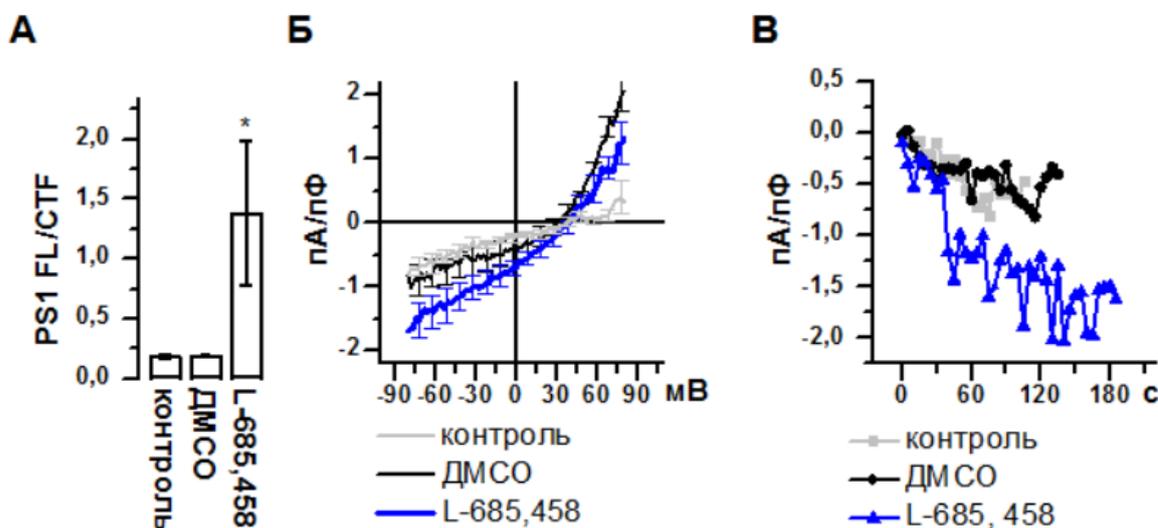


Рисунок 20. Снижение уровня эндопротеолиза вызывает повышение амплитуды тока депо-управляемого входа кальция ( $I_{SOC}$ ) в клетках Neuro2a. Клетки Neuro2a инкубировали в течение 18 часов с 7 мкМ L-658,458 или 0,1% ДМСО, в качестве контроля использовали необработанные клетки. А. Результаты оценки соотношения полноразмерного белка (PS1 FL) к его терминальному фрагменту (CTF) в лизатах Neuro2. Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) Б. Вольтамперные характеристики  $I_{SOC}$ . Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 7-10$ ). Г. Примеры развития амплитуды  $I_{SOC}$  во времени на потенциале -80 мВ.

При записи токов с целых клеток (в конфигурации whole-cell) пассивное опустошение депо с 1 мкМ Tg в клетках Neuro2a приводило к активации входящих токов ( $I_{SOC}$ ) с линейной формой вольтамперных характеристик, обладающих потенциалом реверсии ( $E_{rev}$ ) около 35 мВ (Рисунок 20, Б). Было обнаружено, что амплитуда токов  $I_{SOC}$  практически неразличима в контрольных (необработанных) клетках и в клетках, инкубированных с ДМСО: не более  $-0,79 \pm 0,264$  и  $-0,65 \pm 0,135$  пА/пФ соответственно при потенциале -70 мВ (Рисунок 20, Б, В). Напротив, амплитуда Tg-

индуцированных токов  $I_{SOC}$  в клетках с подавлением эндопротеолиза эндогенного PS1 была значительно увеличена по сравнению с контрольными клетками, достигая максимума  $-1,41 \pm 0,286$  пА/пФ при  $-70$  мВ (Рисунок 20, Б, В)

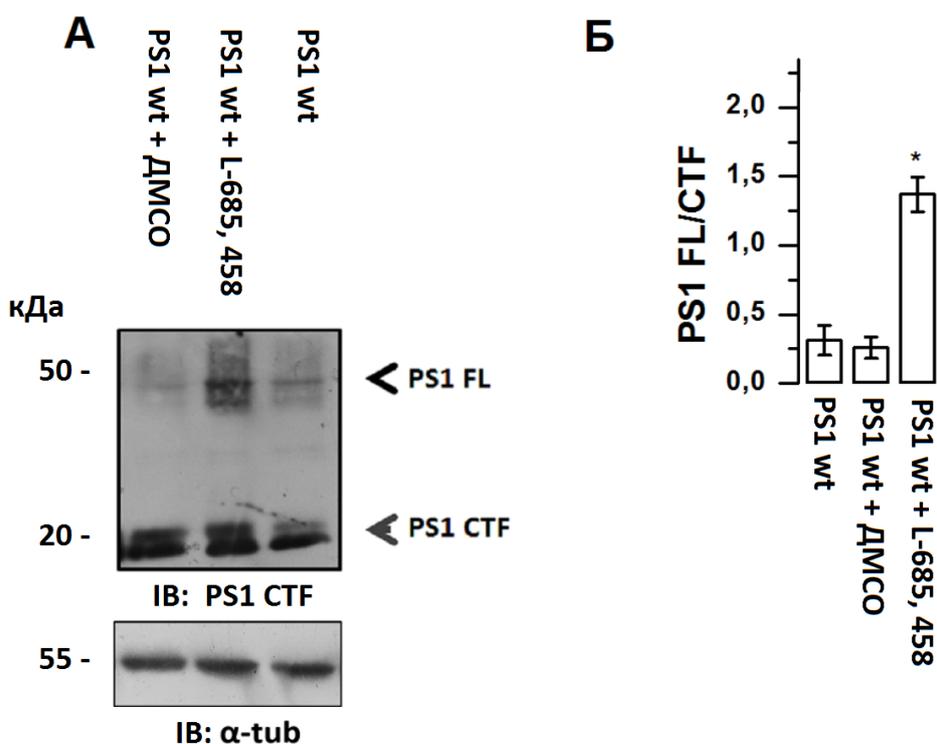


Рисунок 21. Подавление эндопротеолиза Neuro2a с экспрессией PS1 (PS1 wt) дикого типа человека. Клетки Neuro2a инкубировали в течение 18 часов с 7 мкМ L-658,458 или 0,1% ДМСО, в качестве контроля использовали необработанные клетки. А. Иммуноблоттинг лизатов Neuro2a, экспрессирующих PS1 дикого типа с антителами к PS1 CTF. Уровень белка контролировался иммуноблоттингом с моноклональными антителами к  $\alpha$ -тубулину. Б. Результаты оценки соотношения полноразмерного белка (PS1 FL) к его терминальному фрагменту (CTF) в лизатах Neuro2. Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

Чтобы подтвердить влияние уровня эндопротеолиза PS1 на  $I_{SOC}$ , эксперименты по инкубации с 7 мкМ L-658,458 или 0,1% ДМСО были повторены с клетками Neuro2a, экспрессирующими PS1 человека дикого типа (Рисунок 21, А, Б). Как и в нетрансфицированных клетках, фармакологическое

ингибирование эндопротеолиза PS1 в клетках, экспрессирующих PS1 дикого типа, привело к усилению амплитуды  $I_{SOC}$  (Рисунок 22, А, Б): при потенциале -70 мВ максимальная амплитуда Tg-индуцированного тока в трансфицированных клетках с ингибированным эндопротеолизом PS1 достигала  $-1,7 \pm 0,36$  пА/пФ, по сравнению с  $0,71 \pm 0,136$  пА/пФ в клетках, инкубированных с ДМСО и  $-0,77 \pm 0,243$  пА/пФ в необработанных клетках (Рисунок 22, А, Б).

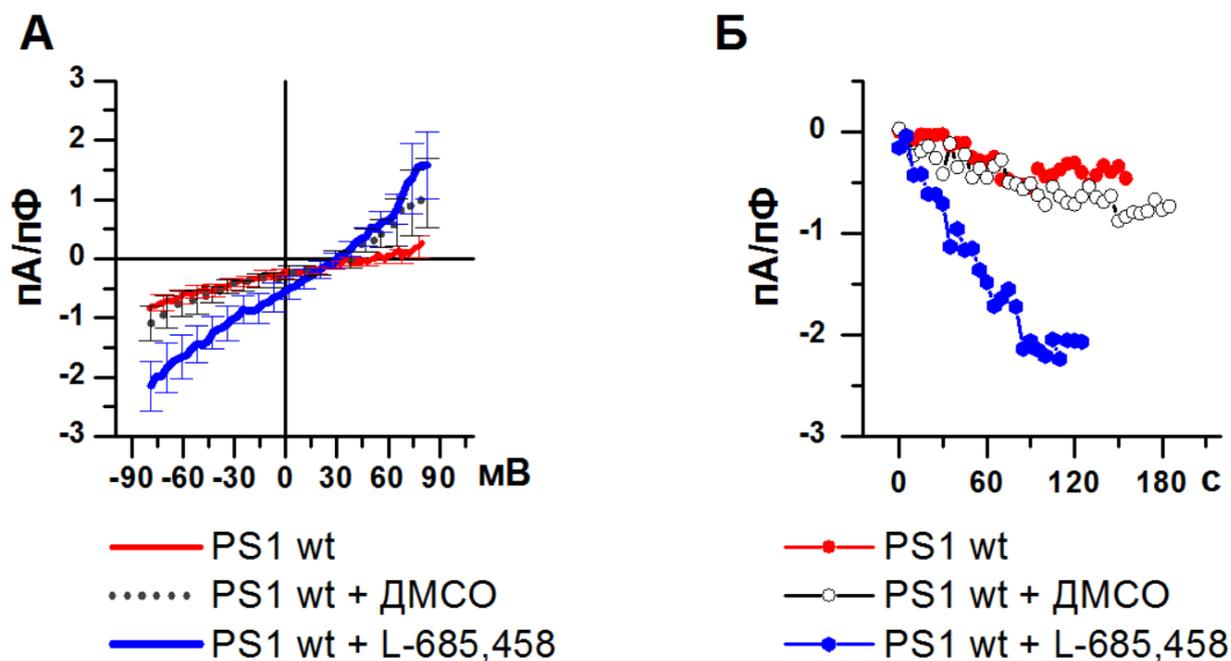


Рисунок 22. Повышение амплитуды тока депо-управляемого входа кальция ( $I_{SOC}$ ) в клетках Neuro2a с экспрессией PS1 дикого типа (PS1 wt) человека в результате подавления эндопротеолиза PS1. Клетки Neuro2a инкубировали в течение 18 часов с 7 мкМ L-658,458 или 0,1% ДМСО, в качестве контроля использовали необработанные клетки. А. Вольтамперные характеристики  $I_{SOC}$ . Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 8-11$ ). Б. Примеры развития амплитуды  $I_{SOC}$  во времени на потенциале -80 мВ.

Следовательно, подавленный эндопротеолиз экзогенного человеческого PS1, также, как и нативного мышинового PS1, увеличивает амплитуду  $I_{SOC}$  в клетках Neuro2a (Рисунок 22). Потенциалы реверсии интегральных токов не отличались значительно между контрольными и экспериментальными группами клеток. Депо-управляемые каналы

образованы двумя группами белков: TRPC и Orai. Потенциал реверсии ( $E_{rev}$ ) токов каналов, образованных TRPC составляет не более 20 мВ (Strübing et al., 2003; Storch et al., 2012), тогда как у каналов, образованных Orai, может превышать 50 мВ (DeHaven et al., 2007). Наблюдаемый  $E_{rev}$  около 35 мВ (Рисунок 22, А) может быть следствием совместной работы каналов, образованных TRPC и Orai, которая регистрировалась как интегральный ток от всей клеточной мембраны. Поэтому изменения амплитуды  $I_{SOC}$  без изменений в  $E_{rev}$ , вероятно, является следствием одновременной гиперактивации всех депо-управляемых кальциевых каналов, без доминирования каналов, образованных Orai, или каналов, образованных TRPC.

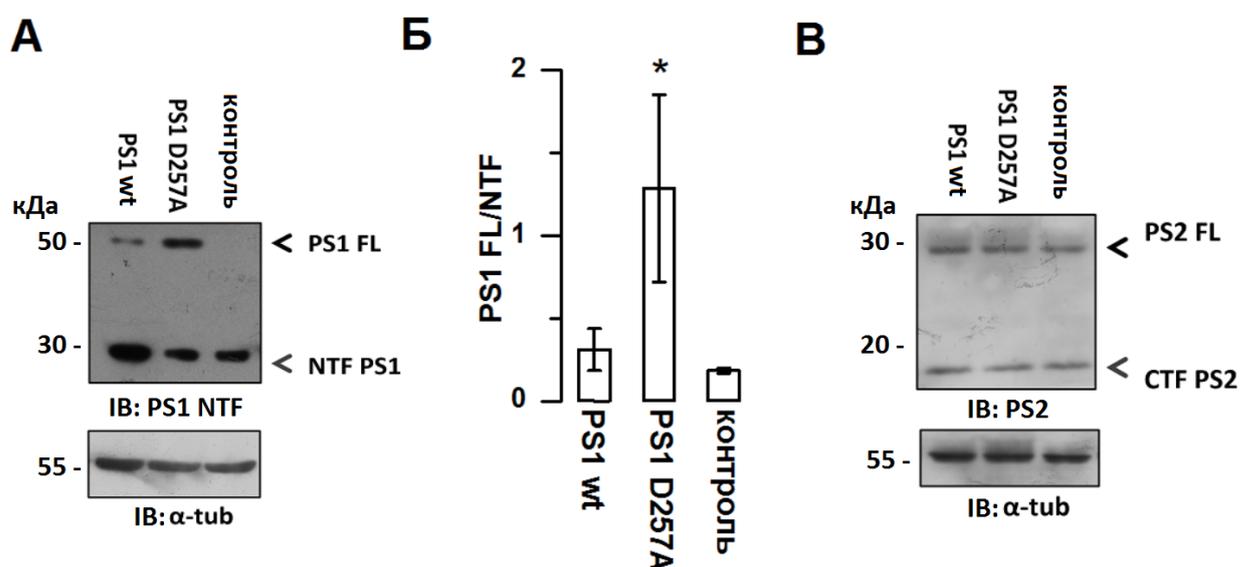


Рисунок 23. Увеличение количества полноразмерного PS1 относительно его терминального фрагмента в результате экспрессии PS1 D257A, не обладающего ферментативной активностью в клетках Neuro2a. (PS1 wt – PS1 дикого типа, контроль – клетки без трансфекции) А. Иммуноблоттинг лизатов Neuro2a с антителами к PS1 NTF. Уровень белка контролировался иммуноблоттингом с моноклональными антителами к α-тубулину. Б. Результаты оценки соотношения полноразмерного белка (PS1 FL) к его терминальному фрагменту (NTF) в лизатах Neuro2. Данные показаны как среднее ± SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). В. Иммуноблоттинг лизатов

*Neuro2a с антителами к PS2. Уровень белка контролировался иммуноблоттингом с моноклональными антителами к  $\alpha$ -тубулину.*

3.4. Увеличение отношения полноразмерного PS1 к его терминальному фрагменту увеличивает  $I_{SOC}$  в клетках Neuro2a.

В связи с тем, что экспрессия экзогенного человеческого PS1 с нормальным уровнем эндопротеоза не влиял на амплитуду  $I_{SOC}$ , было сделано предположение, что изменения в активации депо-управляемых кальциевых каналов могут быть связаны с увеличением уровня полноразмерного PS1 относительно его концевой фрагмента. Для достижения увеличения уровня полноразмерного PS1 без влияния на уровень эндогенных терминальных фрагментов PS1 в клетках Neuro2a был экспрессирован PS1 D257A, который не подвергался эндопротеолизу из-за полной потери ферментативной активности (Brunkan et al., 2005). Экспрессия PS1 D257A привела к увеличению уровня полноразмерного PS1 (Рисунок 23, А, Б), не влияя на уровень эндопротеолиза PS2 (Рисунок 23, В). Электрофизиологический анализ  $I_{SOC}$  в клетках, экспрессирующих PS1 D257A, показал увеличение амплитуды токов, которая достигла  $-1,27 \pm 0,239$  пА/пФ при потенциале  $-70$  мВ. Для сравнения, амплитуда токов в клетках с экспрессией человеческого PS1 дикого типа была почти такой же, как и в контрольных (нетрансфицированных клетках):  $-0,73 \pm 0,241$  и  $-0,71 \pm 0,236$  пА/пФ, соответственно, при потенциале  $-70$  мВ (Рисунок 24, А, Б). Таким образом, можно сделать вывод о том, что повышенный уровень полноразмерного PS1 в клетках приводит к гиперактивации депо-управляемых каналов.

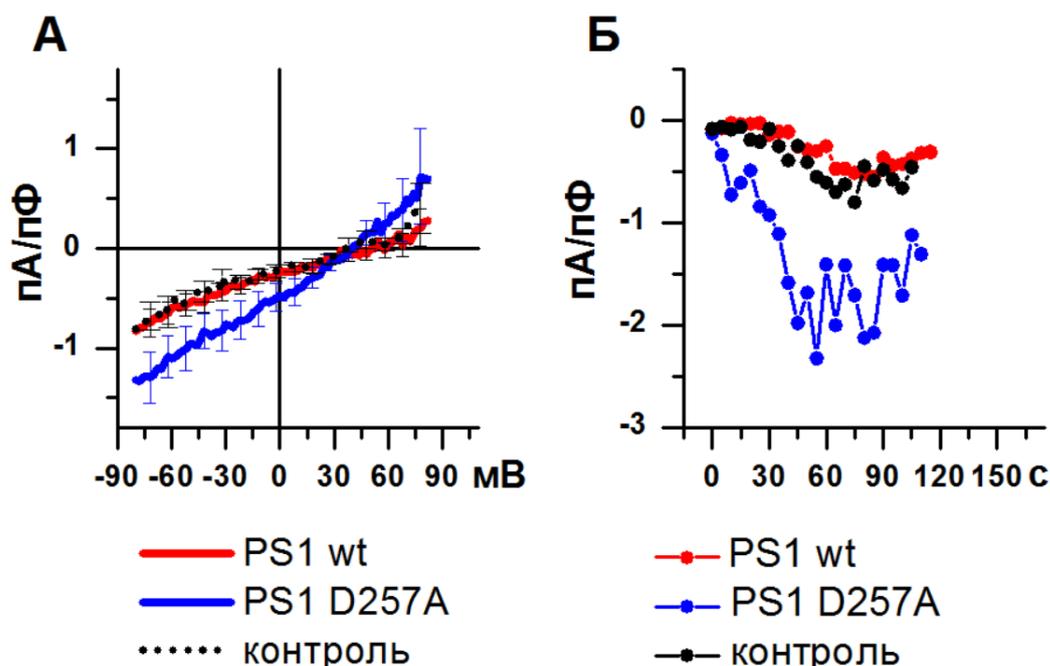


Рисунок 24. Повышение амплитуды тока депо-управляемого входа кальция ( $I_{SOC}$ ) в клетках *Neuro2a* с экспрессией PS1 D257A, не обладающего ферментативной активностью. (PS1 wt – PS1 дикого типа, контроль – клетки без трансфекции) А. Вольтамперные характеристики  $I_{SOC}$ . Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 9-12$ ). Б. Примеры развития амплитуды  $I_{SOC}$  во времени на потенциале  $-80$  мВ.

Такой же эффект на  $I_{SOC}$  был обнаружен в клетках ДКО с экспрессией мутанта PS1 D257A. Амплитуда токов достигала  $-2,52 \pm 0,401$  пА/пФ при потенциале  $-70$  мВ, то время как в контрольных клетках и клетках с экспрессией PS1 дикого типа амплитуды составляли  $1,02 \pm 0,145$  пА/пФ и  $1,47 \pm 0,230$  пА/пФ соответственно, при потенциале  $-70$  мВ (Рисунок 25, А, Б). Следовательно, изменение количественного отношения полноразмерного PS1 к его концевому фрагменту в пользу полноразмерной формы, по-видимому, являются ключевым фактором, ответственным за наблюдаемое увеличение амплитуды токов депо-управляемого входа кальция.

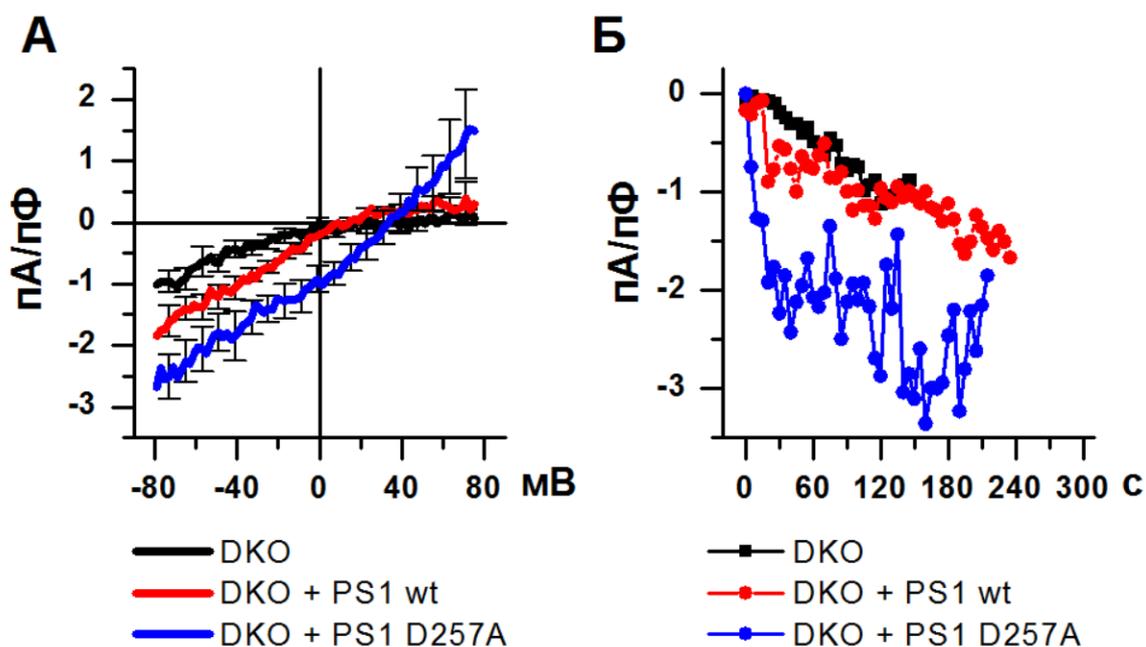


Рисунок 25. Повышение амплитуды тока депо-управляемого входа кальция ( $I_{SOC}$ ) в клетках MEF DKO с экспрессией PS1 D257A, не обладающего ферментативной активностью. (PS1 wt – PS1 дикого типа) А. Вольтамперные характеристики  $I_{SOC}$ . Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 4-5$ ). Б. Примеры развития амплитуды  $I_{SOC}$  во времени на потенциале -80 мВ.

3.5. Гиперактивация депо-управляемых кальциевых каналов в клетках Neuro2a, вызванная накоплением полноразмерного PS1, не является следствием изменений уровней экспрессии основных белков, определяющих депо-управляемый вход кальция.

Известно, что многие белки участвуют в регуляции депо-управляемого входа кальция, причем основные роли играют члены трех белковых семейств: Orai, TRPC и STIM (Hoth et al., 2013; Cheng et al., 2013). Семейство Orai состоит из трех белков: Orai1, Orai2 и Orai3. Все три белка являются субъединицами депо-управляемых каналов (Hoth et al., 2013). Для выявления возможных особенностей экспрессии белков Orai в клетках Neuro2a, с повышенным уровнем полноразмерного человеческого PS1, лизаты клеток, экспрессирующих PS1 дикого типа или PS1 D257A, анализировали путем иммуноблоттинга с антителами к Orai1, Orai2 и Orai3 (Рисунок 26). В

результате не было выявлено никаких различий в уровнях этих белков между клетками, экспрессирующими PS1 дикого типа или PS1 D257A, а также между этими и контрольными клетками. Было показано, что семейство TRPC также участвует в образовании депо-управляемых каналов (Sundivakkam et al., 2012; Cheng et al., 2013; Sun et al., 2014), причем каналы TRPC1 и TRPC4 активируются сенсором STIM1 (Sundivakkam et al., 2012). Уровни экспрессии TRPC1 и TRPC4 также оказались одинаковыми в клетках Neuro2, экспрессирующих PS1 дикого типа или PS1 D257A, и в нетрансфицированных клетках (Рисунок 26). Кроме того, был проведен иммуноблоттинг для анализа уровня белков STIM, которые являются проводниками сигнала от ЭР до депо-управляемых каналов в плазматической мембране (Brandman et al., 2007) и для белка IP3R 1, который также, как было показано, регулирует депо-управляемые каналы (Kiselev et al., 1999; Kaznacheyeva et al., 2000). Никаких изменений в уровнях этих белков по сравнению с контролем не было выявлено ни в клетках, экспрессирующих PS1 дикого типа, ни в клетках экспрессирующих PS1 D257A (Рисунок 26). Никаких изменений уровней белков STIM относительно контроля не выявлено и в клетках ДКО, экспрессирующих либо PS1 дикого типа, либо PS1 D257A (Рисунок 26). Таким образом увеличение уровня полноразмерного PS1 в клетках не влияет на экспрессию основных субъединиц каналов и их регуляторных белков.

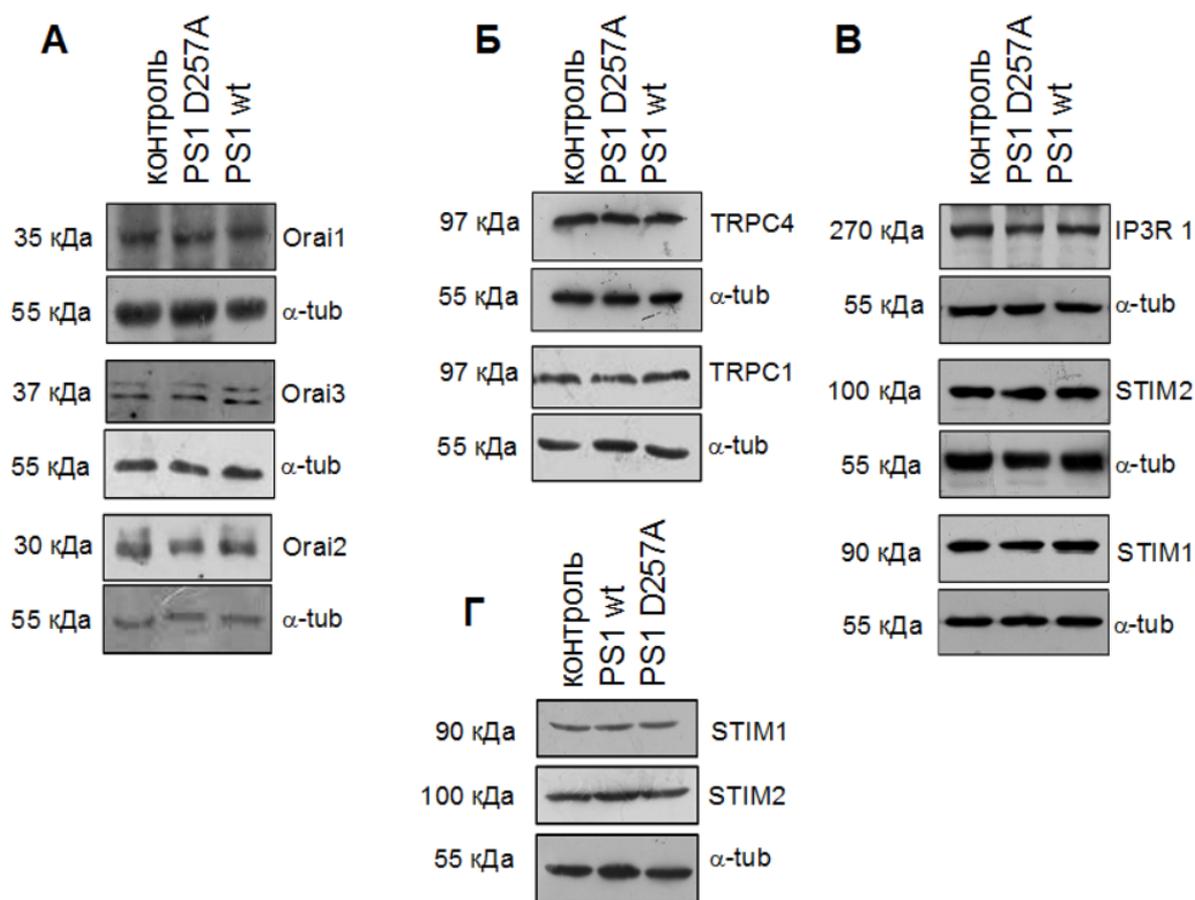


Рисунок 26. Анализ уровня экспрессии основных белков, вовлеченных в депо-управляемый вход кальция, в клетках *Neuro2a* и *MEF DKO*, экспрессирующих человеческий *PS1* дикого типа (*PS1 wt*) или мутант *PS1 D257A*, и нетрансфицированные (контрольные) клетки. Загрузка белка контролировалась иммуноблоттингом с моноклональными антителами к  $\alpha$ -тубулину. Результаты представлены как минимум тремя независимыми экспериментами А. Иммуноблоттинг лизатов *Neuro2a* с поликлональными антителами к *Orai1*, *Orai2* и *Orai3* Б. Иммуноблоттинг лизатов *Neuro2a* с поликлональными антителами к *TRPC1* и *TRPC4*. В. Иммуноблоттинг лизатов *Neuro2a* с поликлональными антителами к *IP3R 1* и *STIM2* и моноклональными антителами к *STIM1*. Г. Иммуноблоттинг лизатов клеток *MEF DKO* с поликлональными антителами к *STIM2* и моноклональными антителами к *STIM1*.

### 3.6. Пониженный уровень эндопротеолиза PS1 усиливает активацию депо-управляемых каналов в нейронах гиппокампа мыши.

Болезнь Альцгеймера поражает преимущественно нейроны гиппокампа и коры (Bekris et al., 2001). Для исследования эффекта пониженного уровня эндопротеолиза PS1 и накопления его полноразмерной формы на активацию депо-управляемых каналов в нейронах гиппокампа, человеческий PS1 D257A был экспрессирован в первичной культуре нейронов гиппокампа мыши с помощью ленти-вирусной трансдукции. В качестве контроля использовали первичную культуру гиппокампа с экспрессией PS1 дикого типа.

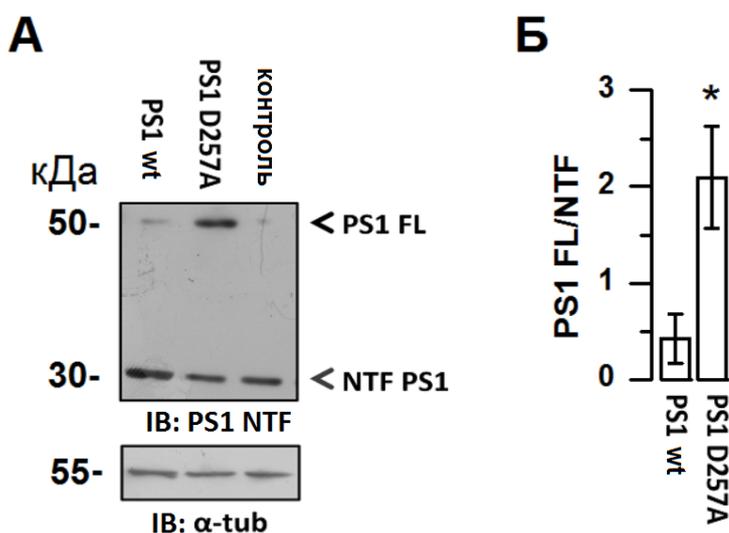


Рисунок 27. Увеличение уровня полноразмерного белка PS1 в нейронах гиппокампа мыши, экспрессирующих неактивный белок PS1 D257A. (PS1 wt – PS1 дикого типа, контроль – нейроны без трансдукции) А. Иммуноблоттинг лизатов первичной культуры нейронов гиппокампа мыши с антителами к PS1 NTF. Уровень белка контролировался иммуноблоттингом с моноклональными антителами к α-тубулину. Б. Результаты оценки соотношения полноразмерного белка (PS1 FL) к его терминальному фрагменту (NTF) в лизатах первичной культуры нейронов гиппокампа мыши. Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

Экспрессия PS1 D257A вызвала увеличение отношения полноразмерного PS1 к NTF (Рисунок 27, А, Б) и усиление амплитуды  $I_{SOC}$  (Рисунок 28, А, Б): при потенциале  $-70$  мВ, этот показатель достиг  $-1,85 \pm 0,418$  пА/пФ, по сравнению с  $-0,9 \pm 0,27$  пА/пФ в контрольных нейронах, экспрессирующих PS1 дикого типа. Таким образом, увеличение отношения полноразмерного PS1 к его терминальным фрагментам приводит к усилению активации депо-управляемых каналов в нейронах (Рисунок 28).

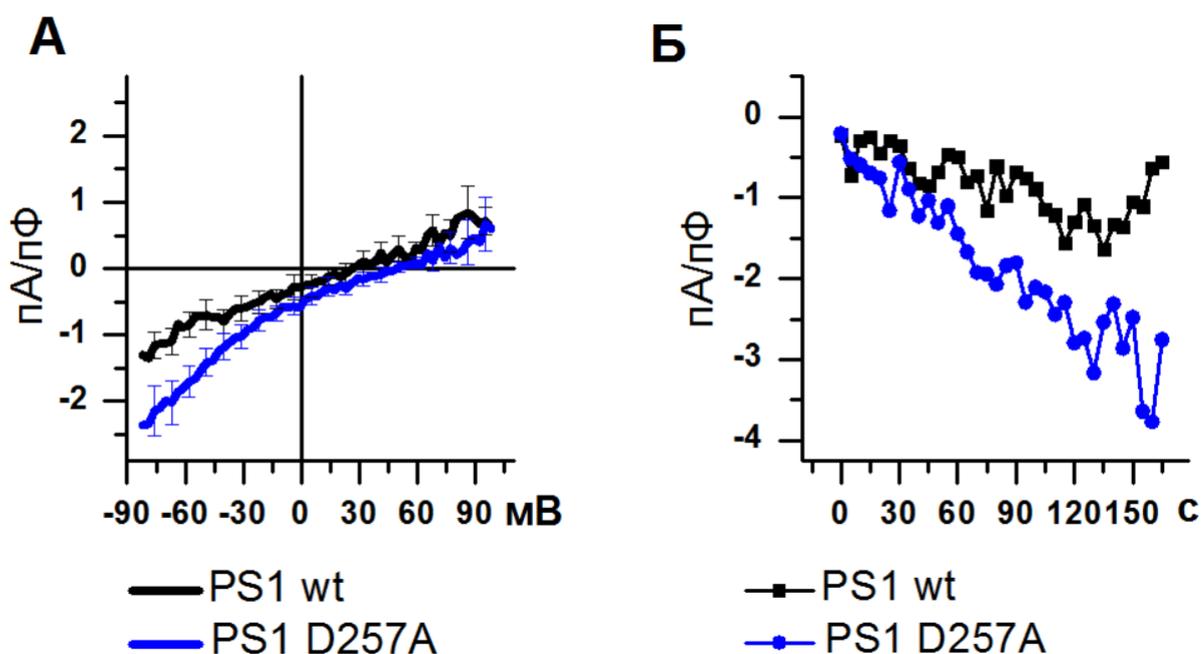


Рисунок 28. Повышение амплитуды тока депо-управляемого входа кальция ( $I_{SOC}$ ) в нейронах гиппокампа мыши с экспрессией PS1 D257A, не обладающего ферментативной активностью. (PS1 wt – PS1 дикого типа) А. Вольтамперные характеристики  $I_{SOC}$ . Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 11-12$ ). Б. Примеры развития амплитуды  $I_{SOC}$  во времени на потенциале  $-80$  мВ.

### 3.7. Создание клеточных моделей наследственной БА.

Связанная с наследственной БА мутация PS1  $\Delta E9$  приводит к исключению 28 аминокислот из цитоплазматической петлевой области белка, которая содержит сайт эндопротеолитического расщепления. Отсутствие сайта расщепления в последовательности белка PS1  $\Delta E9$  приводит к накоплению его полноразмерной нерасщепленной формы (Hiltunen et al.,

2000). Продолжительность жизни PS1 ΔE9 превышает таковую для белка дикого типа; действительно, PS1 ΔE9 обладает относительно высокой стабильностью и более длительным периодом полураспада (~ 40 часов) по сравнению с периодом полураспада PS1 дикого типа (~ 1,5 часа) (Ratovitski et al., 1997). Значительно повышенный уровень полноразмерного белка PS1 ΔE9 был продемонстрирован в человеческих стволовых клетках у пациентов с этой формой наследственной БА (Woodruff et al., 2013). Сообщалось, что PS1 ΔE9 увеличивал амплитуду депо-управляемого входа кальция в клеточной линии нейробластомы человека SH-SY5Y (Boyle et al., 2012). Для изучения клеточных механизмов нарушений регуляции активности депо-управляемых каналов при НБА были созданы клеточные модели. Для этого были использованы первичные культуры нейронов гиппокампа, полученные из мозга мышей линии СЗНА (постнатальный период P0-1), а также клетки нейробластомы мыши линии Neuro2a. Для экспрессии мутантных белков использовали методы трансфекции и ленти-вирусной трансдукции (см. Материалы и методы). Экспрессию белков в клетках подтверждали с помощью иммуноблота или иммуноокрашивания с антителами, специфичными к PS1 человека или HA-tag, который был добавлен к последовательности белка PS1 в ленти-вирусных конструкциях (Рисунок 29).

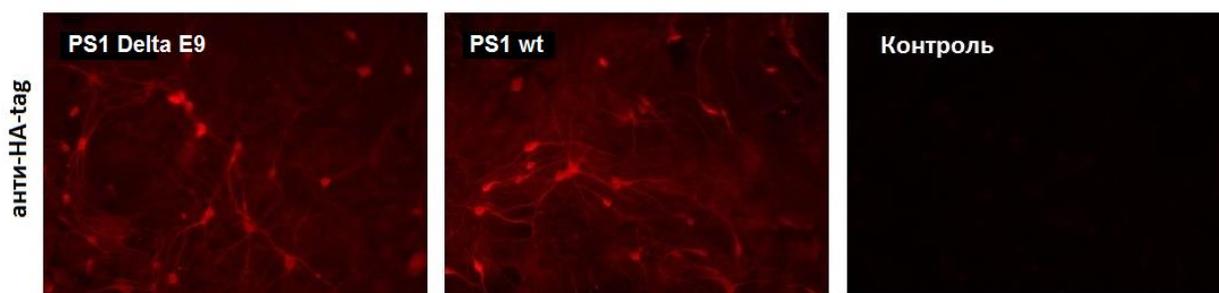


Рисунок 29. Подтверждение экспрессии мутантного белка PS1 (PS1 Delta E9) и PS1 дикого типа в первичной культуре нейронов гиппокампа. Иммуноокрашивание фиксированных нейронов гиппокампа мышей с антителами к HA-tag, а затем антителами, конъюгированными с Cy3.

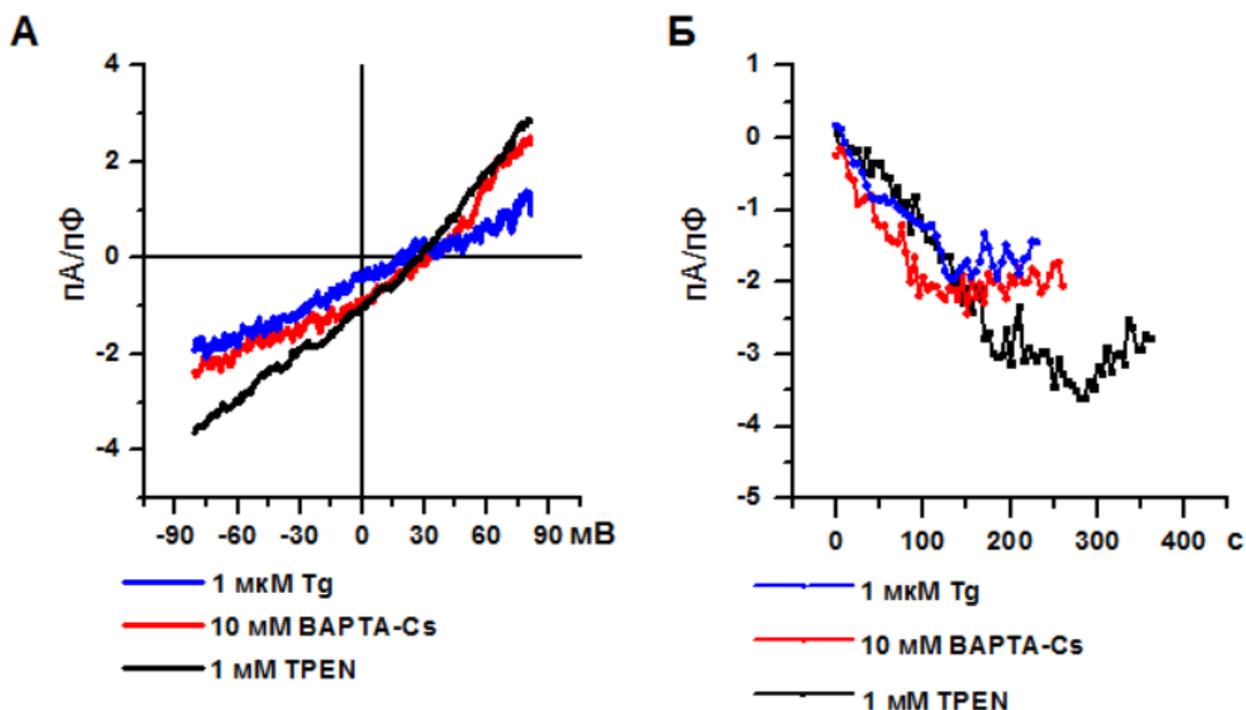


Рисунок 30. Характеристики тока депо-управляемого входа кальция ( $I_{Soc}$ ) в нейронах гиппокампа мыши в условиях опустошения кальциевых депо с помощью тапсигаргина (Tg), хелатора BAPTA или хелатора TPEN. А. Вольтамперные характеристики  $I_{Soc}$ . Данные показаны как репрезентативные записи ( $n = 10$ ). Б. Примеры развития амплитуды  $I_{Soc}$  во времени на потенциале  $-80$  мВ.

3.8. Каналы, образованные белками TRPC1 и Orai1, формируют депо-управляемые кальциевые каналы в нейронах гиппокампа мыши.

В нейронах гиппокампа мыши аппликация  $1$  мкМ Tg активировала входящие токи с линейными вольтамперными характеристиками и  $E_{rev}$  около  $30$  мВ (Рисунок 30, А). Снижение концентрации кальция в ЭР путем пассивного опустошения депо помощью хелатирования кальция в цитоплазме с  $10$  мМ BAPTA в пипеточном растворе или хелатирования кальция в ЭР с помощью аппликации  $1$  мМ TPEN ( $1$  минута в растворе  $0$  Ва) привело к активации токов с теми же свойствами (Рисунок 30, А). В связи с тем, что  $E_{rev}$  токов каналов, образованных белками TRPC, составляет не более  $20$  мВ (Strübing et al., 2003; Storch et al., 2012), а для Orai - превышает  $50$  мВ, то суперпозиция TRPC и Orai может привести к токам с умеренным  $E_{rev}$ . Чтобы

рассмотреть роль Orai1 и TRPC1 в депо-управляемом входе кальция в нейронах гиппокампа, мы использовали knock-down со специфическими shRNA, которые были экспрессированы в нейронах с помощью лентивирусной трансдукции.

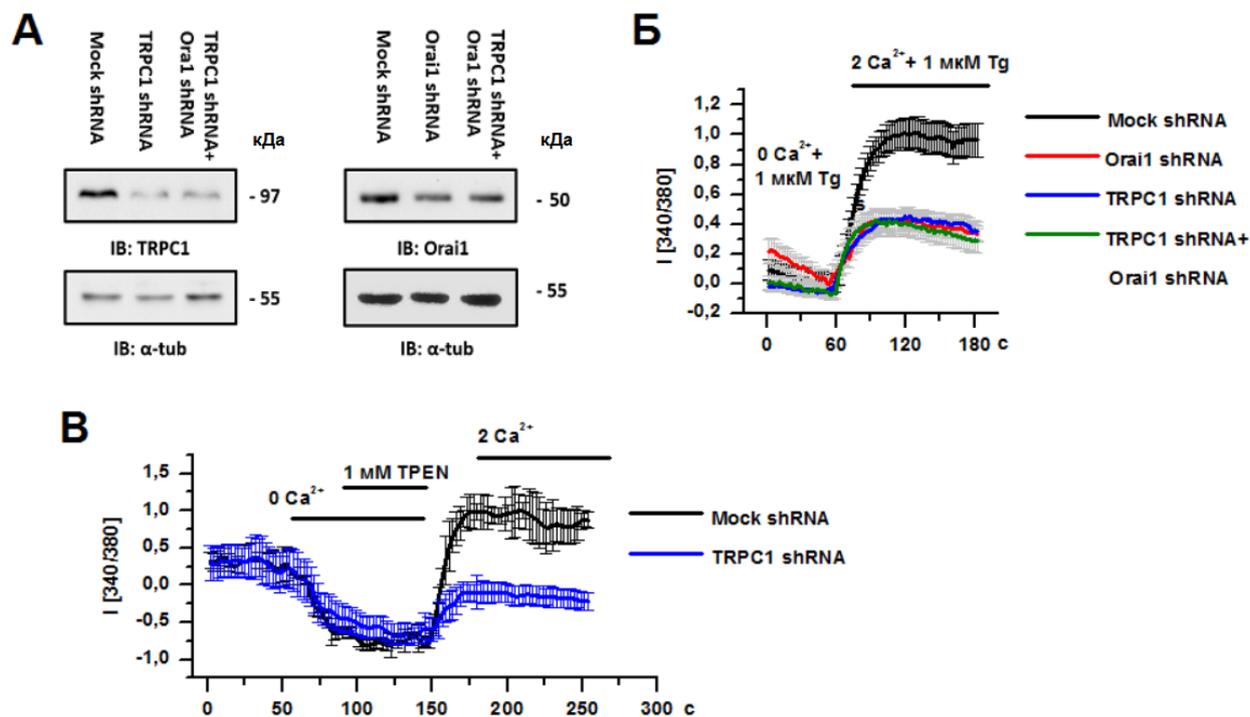


Рисунок 31. Белки TRPC1 и Orai1 являются субъединицами депо-управляемых каналов в нейронах гиппокампа мыши. Подавление экспрессии белков осуществляли с помощью shRNA против Orai1 (Orai1 shRNA) против TRPC1 (TRPC1 shRNA) против Orai1 и TRPC1 (TRPC1 shRNA + Orai1 shRNA), Mock shRNA - контрольная shRNA. А Иммуноблоттинг лизатов культуры нейронов гиппокампа с моноклональными (Orai1) и поликлональными (TRPC1) антителами. Загрузка белка контролировалась иммуноблоттингом с моноклональными антителами к  $\alpha$ -тубулину. Б. Измерение динамики внутриклеточной концентрации кальция в нейронах гиппокампа. ( $0 \text{ Ca}^{2+}$  - безкальцевый раствор,  $2 \text{ Ca}^{2+}$  - раствор с 2 мМ кальция, Tg - тапсигаргин). Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ,  $n = 31-46$ ). В. Измерение динамики внутриклеточной концентрации кальция в нейронах гиппокампа. ( $0 \text{ Ca}^{2+}$  - безкальцевый раствор,  $2 \text{ Ca}^{2+}$  - раствор с 2 мМ кальция). Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ,  $n = 21$ ).

Снижение уровней экспрессии белков Orai1 или TRPC1 привело к значительному уменьшению депо-управляемого входа кальция, активированного пассивным опустошением депо с 1 мкМ Tg в нейронах в экспериментах с измерением динамики внутриклеточной концентрации кальция (Рисунок 31, А, Б). Одновременное понижение уровней белков Orai1 и TRPC1 привело к тому же уровню снижения входа кальция (Рисунок 31, Б). Ранее было продемонстрировано, что активация TRPC1 зависит от наличия функционального Orai1 (рассмотрено в Ambudkar et al., 2016). Наши данные также совпадают с этим наблюдением, так как эффект knock-down второго белка не был аддитивным. TRPC1 может быть активирован с помощью опустошения кальциевых депо с хелатором TPEN (Ambudkar et al., 2016). Подавление экспрессии TRPC1 привело к значительному уменьшению входа кальция, активированного аппликацией TPEN (Рисунок 31, В). В целом, данные электрофизиологических экспериментов и измерение динамики внутриклеточной концентрации кальция показывают, что депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа мыши поддерживается общей работой каналов, образованных субъединицами Orai1 и TRPC1.

### 3.10. Экспрессия PS1 ΔE9 увеличивает амплитуду $I_{SOC}$ в нейронах гиппокампа мыши.

Ранее было показано, что экспрессия PS1 ΔE9 увеличивает амплитуду депо-управляемого входа кальция в клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y (Boyle et al., 2012). В то же время данный эффект никогда не изучался в нейронах гиппокампа, и свойства каналов, которые участвуют в патологическом входе кальция были не известны. Для подтверждения влияния PS1 ΔE9 на кальциевый вход, он был экспрессирован в первичной культуре мышечных нейронов гиппокампа. В качестве контроля использовали нейроны с экспрессией PS1 дикого типа, и интактные нейроны. Эксперименты с измерением динамики внутриклеточной концентрации кальция показали увеличение амплитуды депо-управляемого входа в ответ на опустошение депо

с 1 мкМ Tg (Рисунок 32, А). В электрофизиологических экспериментах с нейронами гиппокампа пассивное опустошение кальциевых депо с 1 мкМ Tg активировало токи с линейными вольтамперными характеристиками и  $E_{rev}$  около 30 мВ во всех группах нейронов (Рисунок 32, Б). Было обнаружено, что амплитуда токов  $I_{SOC}$  значительно выше в нейронах, экспрессирующих PS1  $\Delta E9$  по сравнению с контрольными нейронами и нейронами, экспрессирующими PS1 дикого типа (Рисунок 32, Б, В), достигая максимума -  $3,76 \pm 1,057$  пА/пФ по сравнению с  $-1,41 \pm 0,286$  пА/пФ и  $-1,05 \pm 0,242$  пА/пФ, соответственно, при -70 мВ.

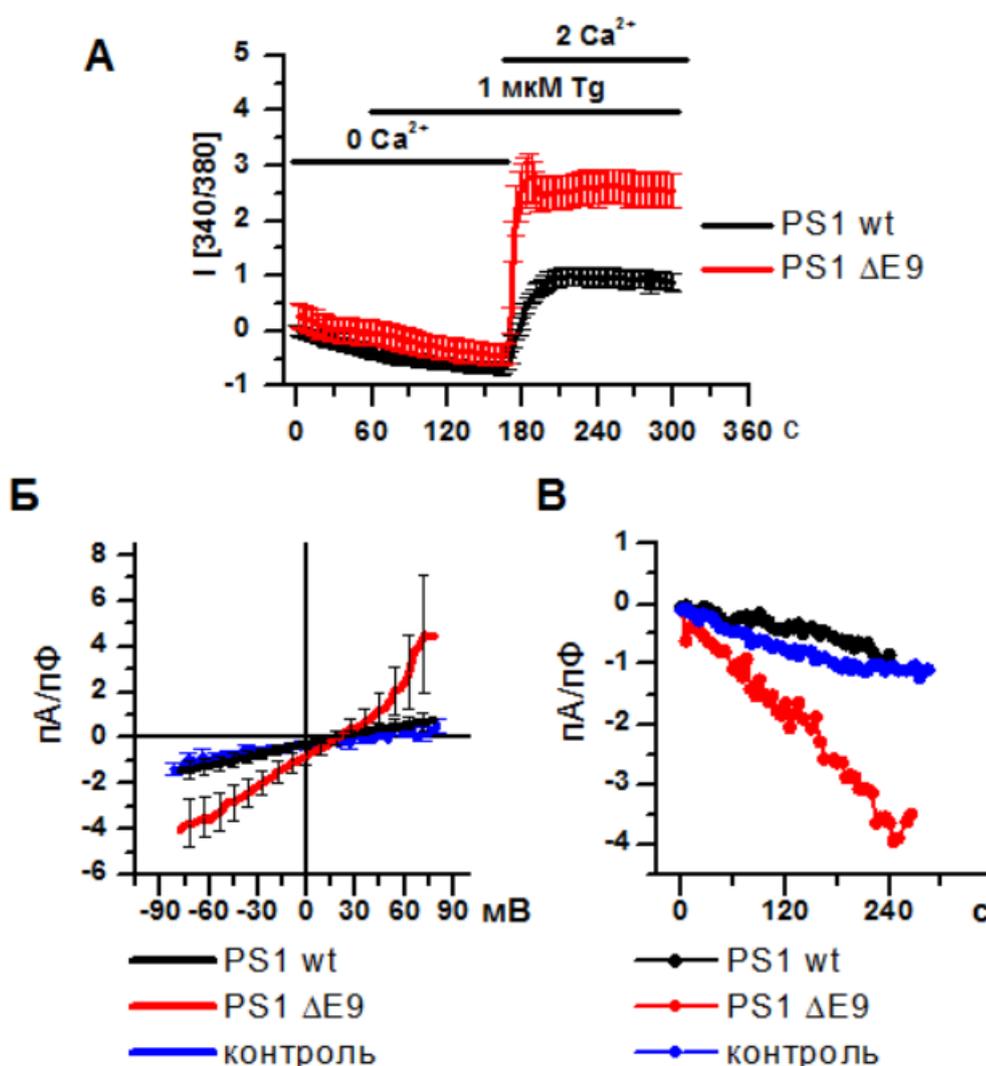


Рисунок 32. Экспрессия PS1  $\Delta E9$  увеличивает амплитуду депо-управляемого входа кальция и  $I_{SOC}$  в нейронах гиппокампа мыши. (PS1 wt – PS1 дикого типа, контроль – нейроны без трансдукции) А. Измерение динамики внутриклеточной концентрации кальция в нейронах гиппокампа. (0  $Ca^{2+}$  -

безкальциевый раствор,  $2 \text{ Ca}^{2+}$  - раствор с 2 мМ кальция, Tg - тапсигаргин). Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ,  $n = 33-57$ ). Б. Вольтамперные характеристики  $I_{\text{SOC}}$ . ( $n = 7-10$ ). Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM В. Примеры развития амплитуды  $I_{\text{SOC}}$  во времени на потенциале  $-80 \text{ мВ}$ .

Эксперименты со снижением экспрессии канальных субъединиц показали, что высокая амплитуда входа кальция обеспечивалась активностью TRPC1 и Orai1, так как снижение уровней экспрессии этих белков (Рисунок 33, А) значительно уменьшало амплитуды входа (Рисунок 33, Б), что также согласуется с электрофизиологическими данными.

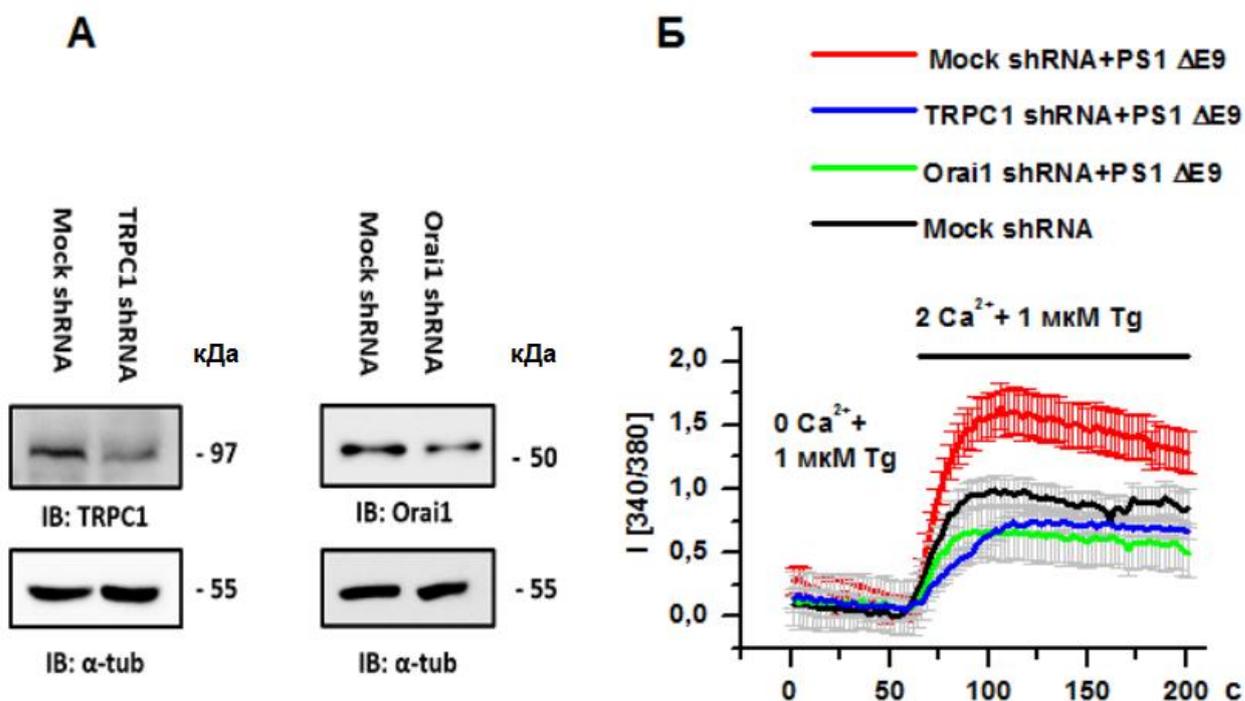


Рисунок 33. Дено-управляемый вход кальция в нейроны с экспрессией PS1 ΔE9 опосредован активацией Orai1 и TRPC1. А. Подавление экспрессии белков осуществляли с помощью shRNA против Orai1 (Orai1 shRNA) против TRPC1 (TRPC1 shRNA), Mock shRNA - контрольная shRNA. А Иммуноблоттинг лизатов культуры нейронов гиппокампа с моноклональными (Orai1) и поликлональными антителами (TRPC1). Загрузка белка контролировалась иммуноблоттингом с моноклональными антителами к α-тубулину. Б. Измерение динамики внутриклеточной концентрации кальция в нейронах

гипокампа. (0 Ca<sup>2+</sup> - безкальциевый раствор, 2 Ca<sup>2+</sup> - раствор с 2 мМ кальция). Данные показаны как среднее ± SEM ( $p < 0,05$ ,  $n = 29-37$ ).

3.11. Экспрессия PS1 ΔE9 увеличивает амплитуду  $I_{SOC}$  и усиливает перемещение сенсоров STIM1 к плазматической мембране в клетках Neuro2a.

Для исследования клеточный механизм гиперактивации депо-управляемых кальциевых каналов в клеточной модели НБА, PS1 ΔE9 был экспрессирован в клетках Neuro2a. Экспрессия PS1 ΔE9 приводила к увеличению уровня полноразмерного белка (Рисунок 34, А). С помощью электрофизиологических экспериментов было обнаружено, что амплитуда  $I_{SOC}$  значительно увеличена в клетках, экспрессирующих PS1 ΔE9 по сравнению с контрольными клетками, экспрессирующими только PS1 дикого типа или GFP, достигая максимума -  $4,24 \pm 0,179$  пА/пФ, -  $0,73 \pm 0,163$  пА/пФ и -  $1,09 \pm 0,29$  пА/пФ соответственно при -70 мВ (Рисунок 34, Б, В).

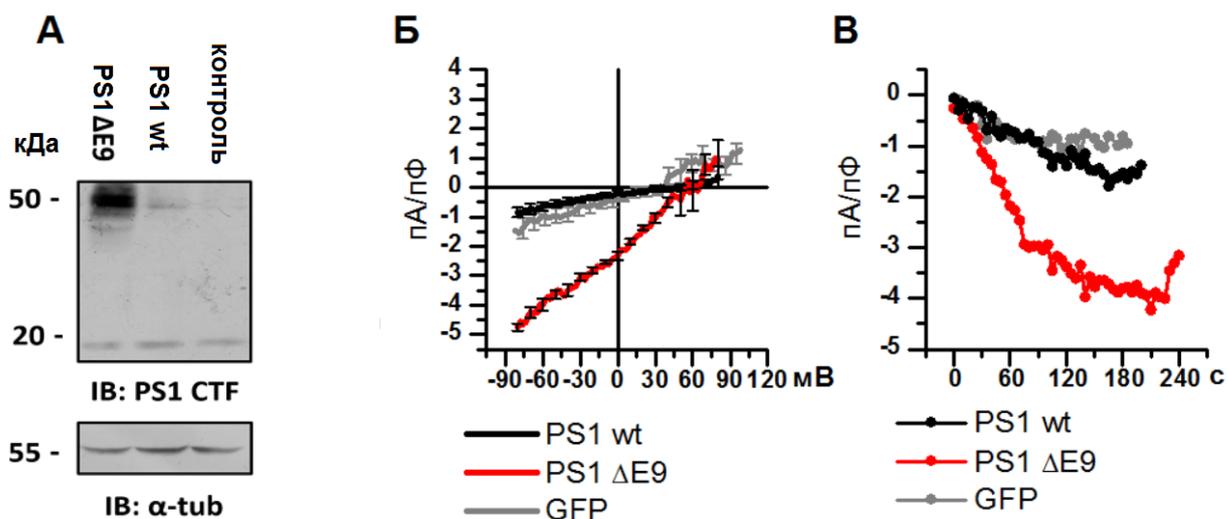


Рисунок 34. Увеличение амплитуды  $I_{SOC}$  в клетках Neuro2, экспрессирующих PS1 ΔE9. А. Иммуноблоттинг лизатов Neuro2a с моноклональными антителами к PS1 CTF (С-терминальный фрагмент). Уровень белка контролировался иммуноблоттингом с моноклональными антителами к α-тубулину. Б. Вольтамперные характеристики  $I_{SOC}$ . ( $n = 5-8$ ). Данные показаны как среднее ± SEM В. Примеры развития амплитуды  $I_{SOC}$  во времени на потенциале -80 мВ.

Депо-управляемые каналы регулируются сенсорами STIM, которые передают сигнал от ЭР к каналам в ПМ. Предполагалось, что в основном активность депо-управляемых каналов в нейронах регулирует STIM1, в отличие от STIM2, который, как считалось, регулирует спонтанную активность депо-управляемых каналов для поддержания входа кальция в клетку, необходимого для заполнения внутриклеточных кальциевых депо (Gruszczynska-Biegala et al., 2011).

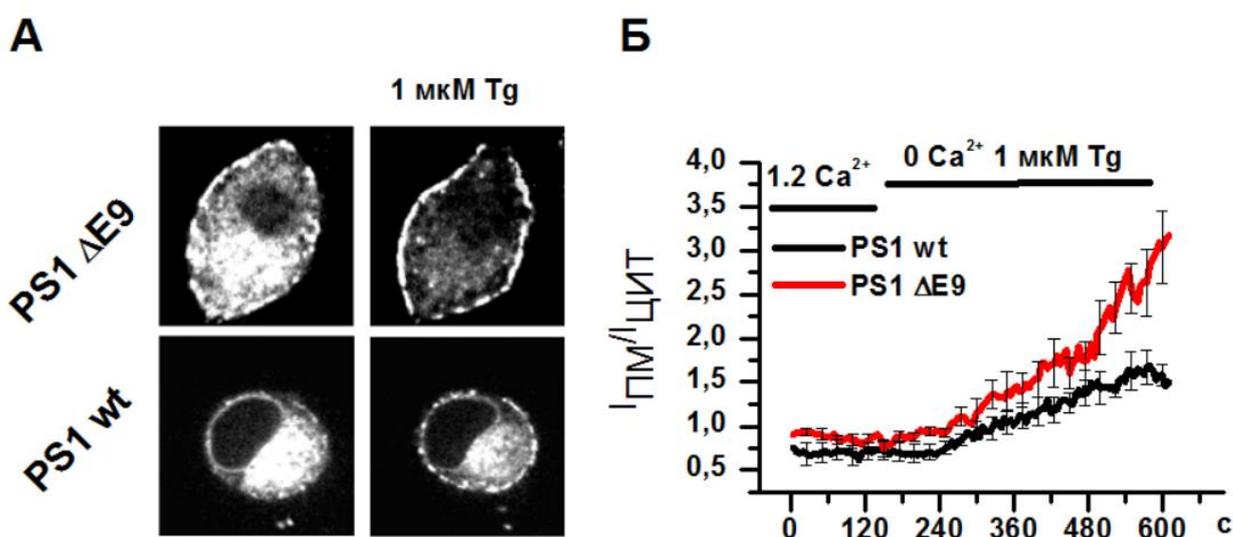


Рисунок 35. Перемещение STIM1 к примембранной области ПМ усилено в клетках Neuro2a, экспрессирующих PS1  $\Delta E9$ . А. Изображения клеток Neuro2a, экспрессирующих STIM1-Cherry и PS1  $\Delta E9$  или PS1 дикого типа (PS1 wt), полученные на конфокальном микроскопе до и после опустошения кальциевых депо с 1  $\mu\text{M}$  Tg (8 минут). Б. Динамика внутриклеточного перемещения STIM1-Cherry, выраженная как соотношение флуоресценций в области ПМ  $I_{\text{ПМ}}$  и цитоплазмы  $I_{\text{ЦИТ}}$  в клетках Neuro2a, экспрессирующих STIM1-Cherry и PS1  $\Delta E9$  или PS1 дикого типа (PS1 wt). Данные нормированы на значения в клетках, экспрессирующих PS1 дикого типа, и показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ,  $n = 10-12$ ).

Клетки Neuro2a были использованы для анализа внутриклеточной активности сенсоров STIM1 с помощью конфокальной микроскопии на живых клетках, в которых был экспрессирован флуоресцентный белок STIM1-Cherry. После опустошения кальциевых депо с 1 мкМ Tg белок STIM1-Cherry перемещался из центра клетки (области ЭР) в примембранную область ПМ (Рисунок 35, А). Динамика перемещения STIM1-Cherry была проанализирована как отношение флуоресценции в примембранной области (I<sub>ПМ</sub>) к флуоресценции цитоплазматической области (I<sub>цит</sub>). В клетках с экспрессией PS1 ΔE9 было обнаружено усиленное перемещение STIM1 по сравнению с клетками с экспрессией PS1 дикого типа (Рисунок 35, А, Б).

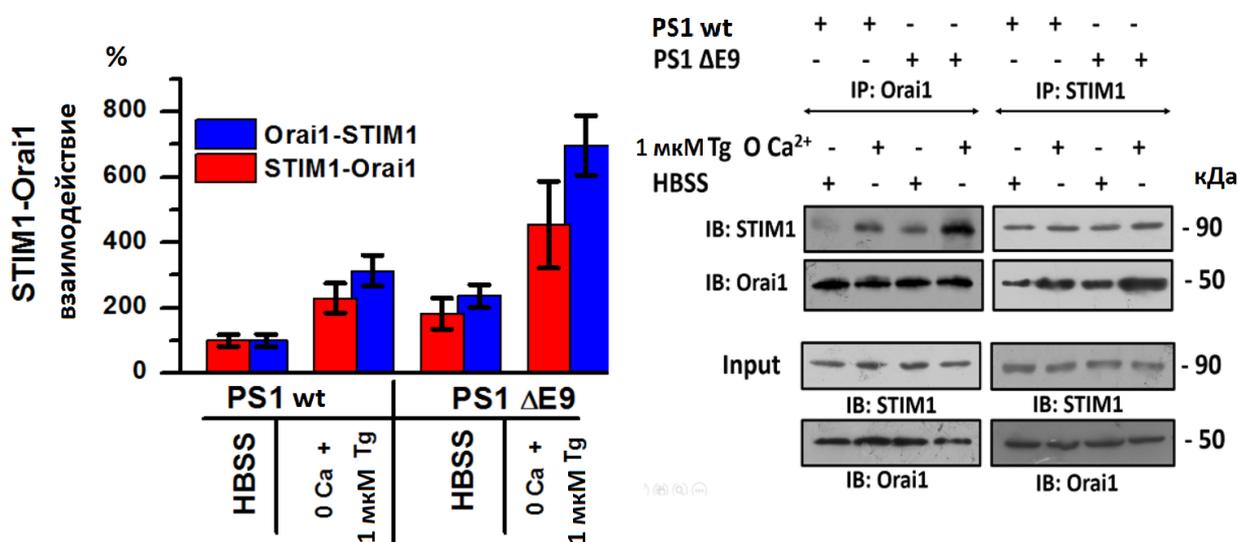


Рисунок 36. Ко-иммунопреципитация эндогенных STIM1 и Orai1 из лизатов Neuro2a. Клетки обрабатывали раствором HBSS или 0 Ca с 1 мкМ тапсигаргина (Tg) в течение 8 мин. Клеточные лизаты иммунопреципитировали (IP) с моноклональными антителами к STIM1 или моноклональными антителами против Orai1. Представлены результаты иммуноблоттинга и его денситометрических измерений, отражающих уровень иммунопреципитации относительно контроля (PS1 дикого типа - PS1 wt) до опустошения депо с 1 мкМ тапсигаргина (Tg), принятого за 100%. Результаты были выражены как средства ± SEM. ( $p < 0,05$ ,  $n = 3$ ).

Для подтверждения усиленной активации STIM1 и его взаимодействия с каналами в ПМ после опустошения кальциевых депо, была проведена ко-

иммунопреципитация STIM1 и Orai1 в клетках Neuro2a. После того как клетки обрабатывали HBSS или 0 Ca раствором с 1 мкг Tg в течение 8 мин при комнатной температуре, наблюдалось большее количество взаимодействующих STIM1 и Orai1 в клетках, экспрессирующих PS1 ΔE9 по сравнению с клетками, экспрессирующими PS1 дикого типа (Рисунок 36). Таким образом, данные свидетельствуют в пользу того, что изменения в амплитуде интегральных токов депо-управляемых каналов происходит в результате усиленной активации и перемещения сенсоров STIM1 к примембранной области, где они взаимодействуют с каналами Orai1.

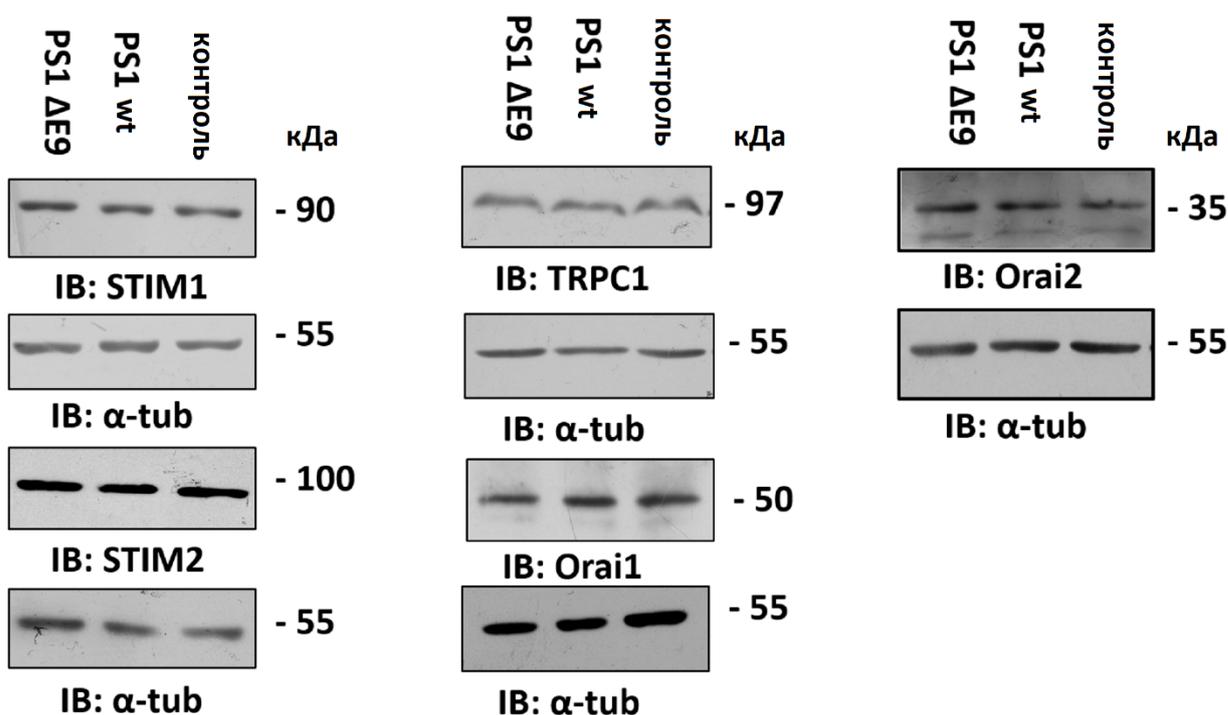


Рисунок 37. Экспрессия PS1 ΔE9 не влияет на уровни экспрессии основных белков, регулирующих депо-управляемый вход. Клетки Neuro2a, экспрессирующие PS1 (PS1 wt) дикого типа человека или мутантный PS1 ΔE9, и нетрансфицированные (контрольные) клетки, анализировали путем иммуноблоттинга с поликлональными антителами к Orai1, Orai2, TRPC1, STIM2 и моноклональным антителам к STIM1. Уровень белка контролировалась иммуноблоттингом с моноклональными антителами к α-тубулину.

3.12. Экспрессия PS1 ΔE9 не влияет на уровни экспрессии основных белков, регулирующих депо-управляемый вход, в клетках Neuro2a.

Лизаты клеток Neuro2a, экспрессирующих PS1 ΔE9 или PS1 дикого типа, были проанализированы путем иммуноблоттинга с антителами к Orai1, Orai2 (Рисунок 37). Никаких различий в уровнях этих белков не было выявлено между клетками, экспрессирующими PS1 дикого типа или мутантный ген, а также между этими и контрольными клетками. Уровни экспрессии TRPC1 также оказались одинаковыми в клетках Neuro2, экспрессирующих мутантный ген или PS1 дикого типа, а также в нетрансфицированных клетках (Рисунок 37). Кроме того, мы провели иммуноблоттинг для белков STIM, которые являются переносчиками сигнала от ЭР к каналам в ПМ. Никаких изменений в уровнях этих белков по сравнению с контролем не было выявлено (Рисунок 37). Таким образом, экспрессия PS1 ΔE9 не влияет на уровень экспрессии основных субъединиц депо-управляемых каналов и их регуляторных белков в клетках Neuro2a. Следовательно, можно заключить, что гиперактивация депо-управляемых каналов была вызвана усилением перемещения STIM1 к области ПМ, но не вызвана изменениями уровня белков STIM1 или STIM2.

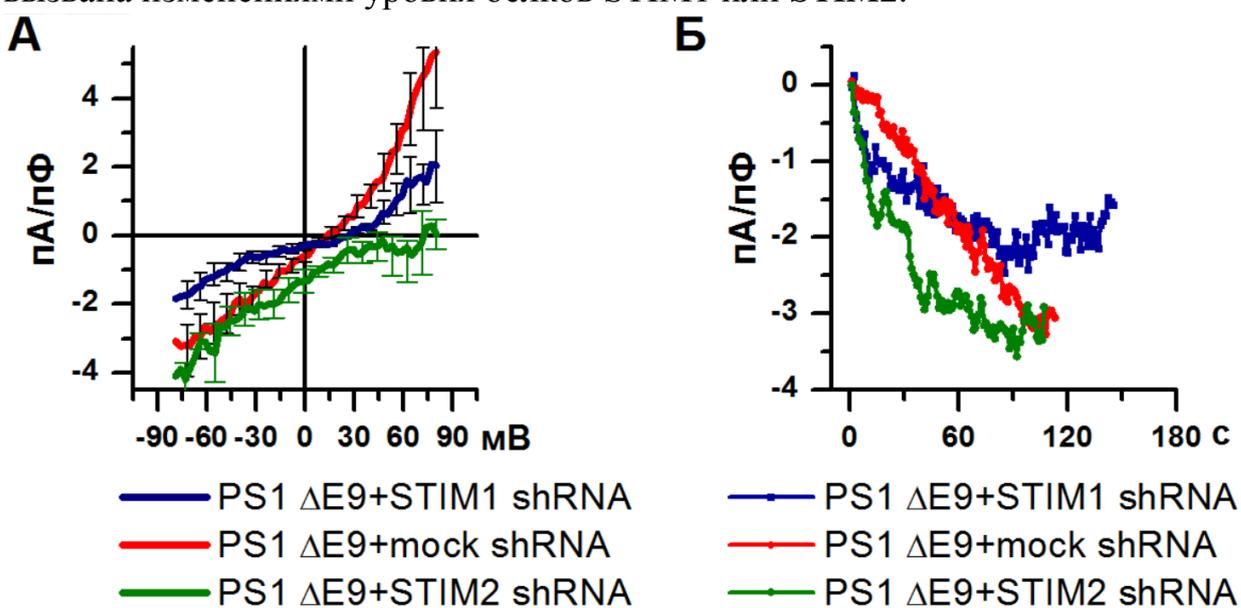


Рисунок 38. Снижение экспрессии STIM1, но не STIM2, восстанавливает нормальную амплитуду  $I_{SOC}$  в нейронах гиппокампа мыши с экспрессией PS1

*ΔE9. Экспрессию белков подавляли с помощью shRNA против STIM1 (STIM1 shRNA), против STIM2 (STIM2 shRNA), mock shRNA - контрольная shRNA. А. Вольтамперные характеристики  $I_{SOC}$  в гиппокампальных нейронах с экспрессией PS1  $\Delta E9$ . Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ,  $n = 6-9$ ). Б. Примеры развития амплитуды  $I_{SOC}$  во времени на потенциале  $-80$  мВ.*

3.13. Понижение экспрессии STIM1 восстанавливает амплитуду  $I_{SOC}$  до контрольных значений в нейронах гиппокампа мыши, экспрессирующих PS1  $\Delta E9$ .

Для исследования роли STIM1 в гиперактивации депо-управляемых каналов в нейронах гиппокампа в мыши, экспрессирующих PS1  $\Delta E9$ , был осуществлен knock-down STIM1 с помощью специфической shRNA. Снижение экспрессии STIM1 уменьшило амплитуду  $I_{SOC}$  до уровня контрольных значений (Рисунок 38, А, Б). Амплитуда токов  $I_{SOC}$  при потенциале  $-70$  мВ достигала максимума -  $3,18 \pm 0,729$  пА/пФ в клетках с экспрессией мутантного гена и неактивной shRNA и  $-1,69 \pm 0,404$  пА/пФ в клетках с экспрессией мутантного гена и shRNA STIM1 (Рисунок 38, А, Б).

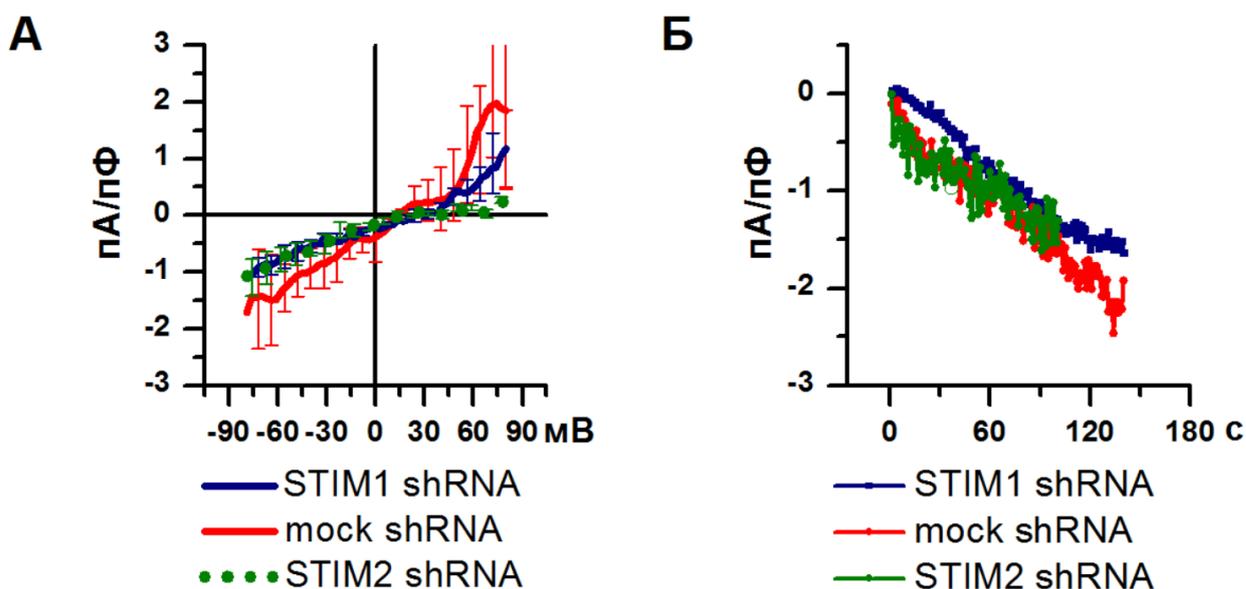


Рисунок 39. Снижение экспрессии STIM1 или STIM2 не влияют на амплитуду  $I_{SOC}$  в нейронах гиппокампа мыши. Экспрессию белков подавляли с помощью shRNA против STIM1 (STIM1 shRNA), против STIM2 (STIM2 shRNA), mock shRNA - контрольная shRNA. А. Вольтамперные характеристики  $I_{SOC}$  в

гиппокампальных нейронах. Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ,  $n = 7-9$ ). Б. Примеры развития амплитуды  $I_{SOC}$  во времени на потенциале  $-80$  мВ.

При этом снижение уровня экспрессии STIM1 в контрольных клетках и клетках, экспрессирующих PS1 дикого типа, не влияло ни на амплитуду тока, ни на другие его характеристики (Рисунок 39; Рисунок 40). Иммуноблоттинг показал отсутствие компенсационной избыточной экспрессии STIM2 в нейронах гиппокампа с нокаутом STIM1 (Рисунок 41).

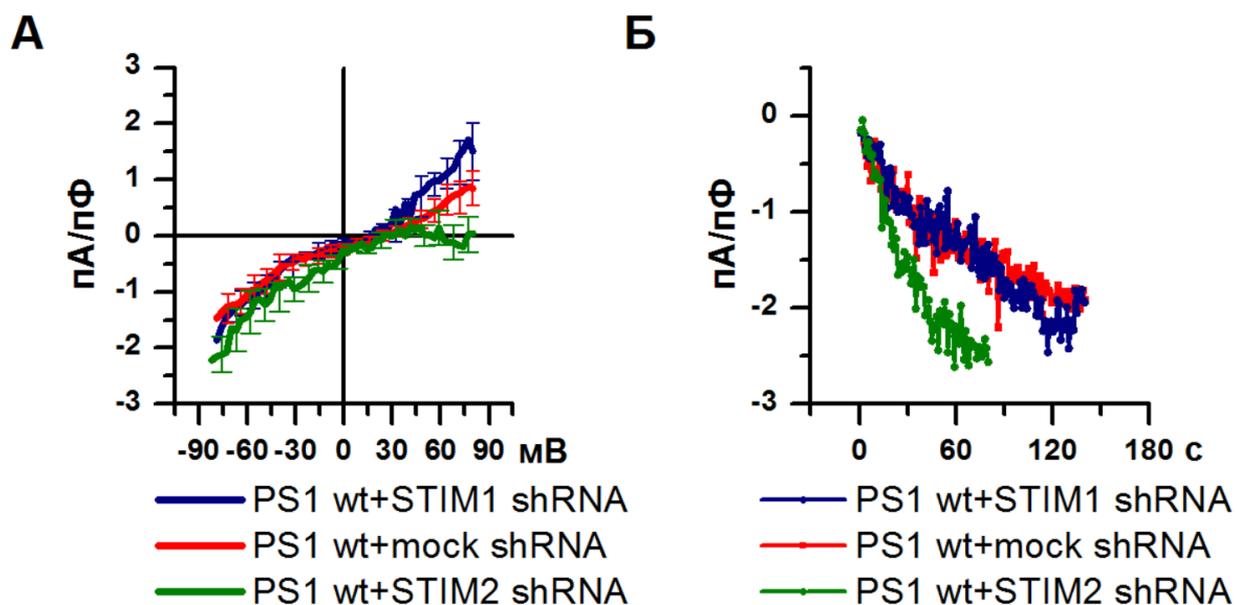


Рисунок 40. Снижение экспрессии STIM1 или STIM2 не влияют на амплитуду  $I_{SOC}$  в нейронах гиппокампа мыши, экспрессирующих PS1 дикого типа (PS1 wt). Экспрессию белков подавляли с помощью shRNA против STIM1 (STIM1 shRNA), против STIM2 (STIM2 shRNA), mock shRNA - контрольной shRNA А. Вольтамперные характеристики  $I_{SOC}$  в гиппокампальных нейронах, экспрессирующих PS1 дикого типа (PS1 wt). Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ,  $n = 5-7$ ). Б. Примеры развития амплитуды  $I_{SOC}$  во времени на потенциале  $-80$  мВ.

Эти данные говорят о том, что STIM1 гиперактивирует депо-управляемые каналы в нейронах гиппокампа с экспрессией PS1  $\Delta E9$  («клеточной модели НБА»), но в контрольных («здоровых») нейронах STIM1, по всей вероятности, либо вообще не играет центральной роли в активации депо-управляемых каналов, либо его knock-down может быть полностью

скомпенсирован активностью STIM2. Преобладающую роль STIM2 в нейронах гиппокампа можно объяснить более чем двукратной разницей в уровне экспрессии по сравнению со STIM1 (Skibinska-Kijek et al., 2009). В то же время снижение экспрессии STIM2 с помощью shRNA не уменьшало амплитуду  $I_{SOC}$  в клетках с экспрессией PS1  $\Delta E9$ , которая достигла максимума -  $3,84 \pm 0,405$  пА/пФ (Рисунок 38). Иммуноблоттинг показал отсутствие компенсационной избыточной экспрессии STIM1 в нейронах гиппокампа с knock-down STIM2 (Рисунок 41). Понижение экспрессии STIM2 в контрольных клетках и клетках с экспрессией PS1 дикого типа не влияла на амплитуду тока (Рисунок 39; Рисунок 40). В то же время, важно отметить, что knock-down STIM2 привел к изменению формы вольтамперных характеристик токов, которые вместо линейных стали подобны  $I_{CRAC}$  и имели характерный для токов, образованных Orai,  $E_{rev} > 60$  мВ (Рисунок 38; Рисунок 39; Рисунок 40). Ранее было показано, что активация TRPC1 абсолютно зависит от наличия функционального Orai в клетках (Ambudkar et al., 2016). Роль активности Orai1 для перемещения и встраивания каналов TRPC1 в ПМ также была продемонстрирована ранее (Cheng et al., 2011). Возможно, что STIM2 регулирует активность Orai, которая необходима для перемещения и встраивания TRPC1 в ПМ в нейронах гиппокампа.

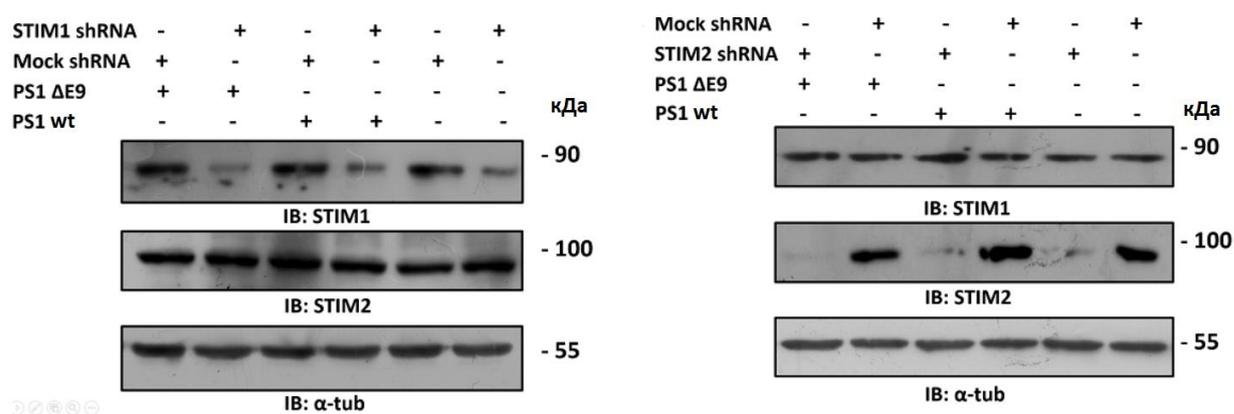


Рисунок 41. Результаты иммуноблоттинга лизатов культуры нейронов гиппокампа с экспрессией shRNA против STIM1 (STIM1 shRNA), против STIM2 (STIM2 shRNA) или контрольной shRNA (Mock shRNA) в дополнение к экспрессии PS1  $\Delta E9$  или PS1 дикого типа (PS1 wt) или в контрольных нейронах.

Белок *STIM1* детектировали моноклональными антителами, а *STIM2* детектировали поликлональными антителами. Уровень белка контролировался иммуноблоттингом с моноклональными антителами к  $\alpha$ -тубулину.

3.13. Трансгенные *Drosophila melanogaster*, экспрессирующие мутантный ген PS1  $\Delta E9$  в холинергических нейронах, демонстрирует зависимость от возраста потерю кратковременной памяти.

Трансгенные *Drosophila melanogaster* широко используются для моделирования БА. Поскольку у мух не образуются А $\beta$ -пептиды, как у человека, из-за существенной разницы в аминокислотной последовательности белка APP и пониженной активности  $\beta$ -секретазы, функция PS1 может быть изучена вне его роли в производстве А $\beta$  (Moloney et al., 2010). Чтобы исследовать влияние экспрессии мутантного гена PS1 на потерю памяти в клетках, которые вовлечены в патологию БА, были выбраны холинергические нейроны ЦНС, поскольку их потеря является ярким признаком БА (Geula et al., 1989). В ЦНС дрозофил основная передача возбуждения обеспечивается холинергической системой. Используемая линия Cha-GAL4, содержит промотор холинэстеразы для экспрессии GAL4, который затем может запустить экспрессию генов под контролем промотера UAS специфически в холинергических нейронах (Salvatterra et al., 2001). Для создания модели НБА была создана трансгенная линия со вставкой в геном человеческого мутантного гена PS1  $\Delta E9$  под контролем промотера UAS (UAS-PS1  $\Delta E9$ ). Для этого осуществляли вставку в геном линии  $y^1w^{1118}$ . Скрещивание линии Cha-GAL4 с UAS-PS1  $\Delta E9$  затем дало линию с экспрессией человеческого PS1  $\Delta E9$  в холинергических нейронах (Cha-GAL4 UAS-PS1  $\Delta E9$ ), что подтверждено иммуноблоттингом лизата головного мозга дрозофил с антителами, специфичным к человеческому PS1 (Рисунок 42, Б). Линия с экспрессией только GFP в холинергических нейронах (Cha-GAL4 UAS-GFP) использовалась в качестве контроля.

Половое поведение и ухаживание часто используются в качестве критерия в исследовании обучения и памяти у дрозофил (Siegel et al., 1979; Hall, 1994; Kamyshev et al., 1999; McBride et al., 2005; Bolduc et al., 2008; Choi et al., 2010; Chakraborty et al., 2011; Vartiainen et al., 2014). Самцы дрозофил выполняют характерную последовательность действий в поведении с самкой: ориентация, вибрация, лапанье, лизание, попытка копуляции (Hall, 1994). Процент времени, в течение которого самец проводит какое-либо из этих действий по отношению к цели называется Индекс Ухаживания (ИУ) (см. Материалы и методы) (Siegel et al., 1979). С помощью поведения ухаживания возможно осуществлять обучение самцов мух, которые учатся не воспринимать нерцептивную самку, которая была уже оплодотворена (Siegel et al., 1979; Hall, 1994). Неоплодотворенные самки обычно реагируют на ухаживания путем спаривания. Однако недавно спарившиеся самки невосприимчивы и имеют перекрывающийся, но измененный феромонный профиль, который самцы находят менее привлекательным, чем у девственных самок (Ejima et al., 2005; Ejima et al., 2007). Необученный самец в паре с оплодотворенной самкой изначально будет осуществлять ухаживание, но со временем снизит его интенсивность. После тренировки с оплодотворенной самкой память измеряется как уменьшение ИУ в отношении другой нерцептивной самки по сравнению с необученным контролем.

Продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* составляет около 60 дней (во взрослой форме после вылупления); поэтому взрослая летящая 5-ти дневная муха относительно «молода», а муха 21-го дневная относительно «умеренно состарившаяся». Поскольку мутация PS1 ΔE9 приводит к проявлению симптомов от 40 до 45 лет (Hiltunen et al., 2000), для анализа памяти и обучения были использованы умеренно состарившиеся самцы в сравнении с молодыми самцами. Сначала были проанализированы самцы 5-ти дневного возраста, для которых определяли ИУ для проверки краткосрочной памяти после обучения. Через 1 час тренировки самцы сразу же перемещались

в чистую камеру с другой нерцептивной самкой. Для эксперимента использовали линию с экспрессией мутантного гена человека в холинэргических нейронах (Cha-GAL4 UAS-PS1 ΔE9), а в качестве контроля линию с экспрессией GFP в холинэргических нейронах (Cha-GAL4 UAS-GFP) и линию со вставкой человеческого гена, но без его экспрессии (UAS-PS1 ΔE9).

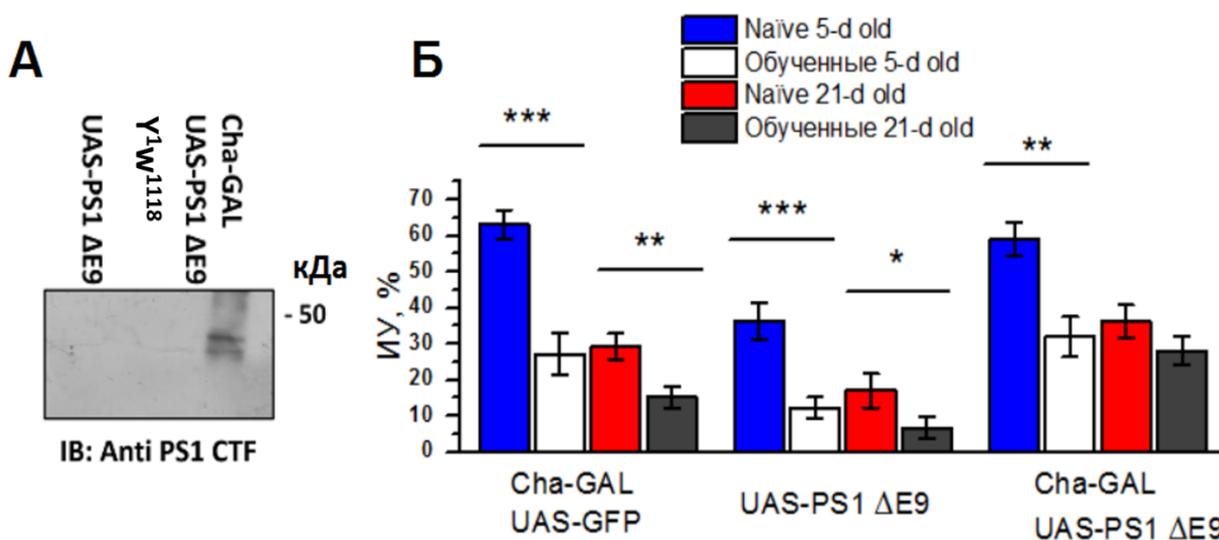


Рисунок 42. Трансгенные дрозофилы с экспрессией PS1 ΔE9 в холинэргической нервной системе демонстрируют нарушения кратковременной памяти с возрастом. А. Иммуноблоттинг лизатов мозга дрозофил линий y<sup>1</sup>w<sup>1118</sup>, UAS-PS1 ΔE9 и Cha-GAL4 UAS-PS1 ΔE9 с моноклональными антителами к PS1 CTF. Б. Анализ ИУ у дрозофил с экспрессией PS1 ΔE9 в холинэргической нервной системе (Cha-GAL4 UAS-PS1 ΔE9) и контрольных линий (Cha-GAL4-GFP и UAS-PS1 ΔE9) в возрасте 5 и 21 день. (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001, n=20).

После обучения все линии продемонстрировали снижение ИУ по сравнению с необученными (Naïve) самцами, что доказывает нормальное состояние кратковременной памяти у молодых животных (Рисунок 42, Б). Затем мы проанализировали кратковременную память у 21-го дневных самцов. У всех линий было отмечено понижение ИУ по сравнению с молодыми самцами, что, по-видимому, связано с возрастными изменениями половой активности. Контрольные линии продемонстрировали снижение ИУ

после тренировки по сравнению с необученными самцами. В тоже время, линия с экспрессией мутантного гена человека PS1 ΔE9 не показывала изменений уровня ИУ после тренировки (Рисунок 42, Б). Таким образом, можно заключить, что экспрессия PS1 ΔE9 в холинергических нейронах самцов дрозофил приводила к потере кратковременной памяти, зависящей от возраста.

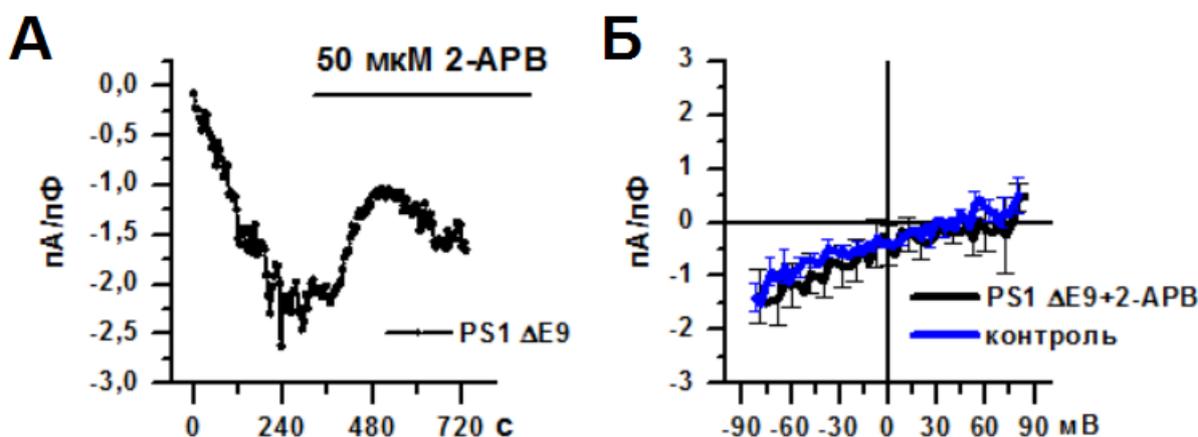


Рисунок 43. 2-Аминоэтоксидифенилборат (2-APB) возвращает амплитуду  $I_{SOC}$  к контрольным значениям в нейронах гиппокампа мыши, экспрессирующих PS1 ΔE9. А. Пример развития амплитуды  $I_{SOC}$  во времени. К нейронам подавали 50 мкМ 2-APB для ингибирования тока. Б. Вольтамперные характеристики  $I_{SOC}$  в нейронах гиппокампа мыши, экспрессирующих PS1 ΔE9, после аппликации 50 мкМ 2-APB и контрольных интактных нейронов гиппокампа. Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0.05$ ,  $n = 7-9$ )

3.14. Ингибитор депо-управляемых кальциевых каналов 2-APB предотвращает потерю кратковременной памяти у трансгенных *Drosophila melanogaster*.

2-Аминоэтоксидифенилборат (2-APB) является мощным и хорошо известным ингибитором депо-управляемых каналов (Bootman et al., 2002). Ингибирующая активность 2-APB на депо-управляемые каналы была доказана для нейронов (Koss et al., 2013). Аппликация 50 мкМ 2-APB для нейронов гиппокампа, экспрессирующих PS1 ΔE9 человека, понижала амплитуду  $I_{SOC}$  до уровня контрольных значений. Амплитуда тока уменьшалась до  $-1,46 \pm$

0,601 пА/пФ, что почти соответствовало контрольной величине -  $1,05 \pm 0,242$  пА/пФ (Рисунок 43 А и Б). Гиперактивация депо-управляемых каналов нейронах может быть причиной дефицита памяти у мух с экспрессией человеческого мутанта PS1 ΔE9. Чтобы исследовать роль депо-управляемых каналов в патологических изменениях в модели БА, мухам ежедневно добавляли в пищу 400 мкМ 2-АРВ, растворенные в ДМСО. Препарат добавляли в пищу самцов, которых кормили новой смесью с пищей каждый день в течение 7 дней до начала теста. В качестве контроля использовали кормление с нормальной пищей и кормление с добавлением ДМСО в пищу. Мы наблюдали значительное снижение половой активности после кормления ДМСО, что можно объяснить отрицательным эффектом ДМСО на здоровье дрозофил (Mollet et al., 1974; Nazir et al., 2003). Однако принципиально, что для обеих контролей – обычной пищи и ДМСО – в возрасте 21-го дня не было обнаружено существенной разницы в ИУ между обученными и необученными самцами, экспрессирующими PS1 ΔE9 в холинергических нейронах, что указывает на дефицит памяти. В тоже время, у группы, в пищу которой добавляли 2-АРВ, было обнаружено сохранение работы кратковременной памяти в том же возрасте (Рисунок 44).

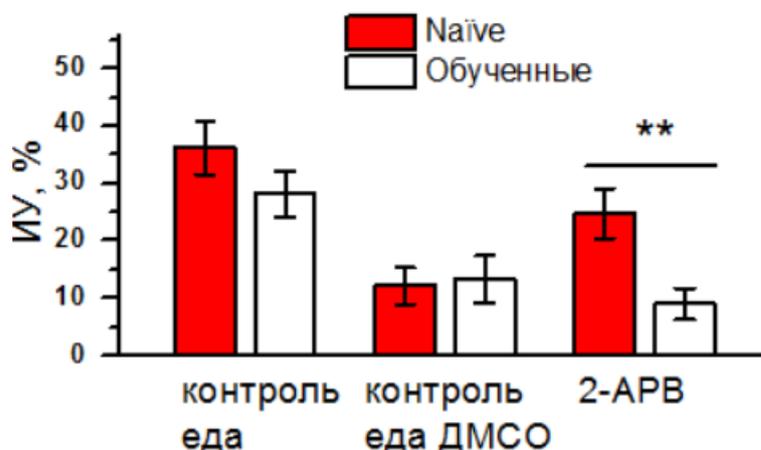


Рисунок 44. Предотвращение потери кратковременной памяти у дрозофил с экспрессией PS1 ΔE9 в холинергической нервной системе с помощью 2-АРВ. В течение 7 дней в еду для мух добавляли 400 мкМ 2-АРВ или

в качестве контроля добавляли ДМСО 0,4% или давали обычную еду. ИУ оценивали на 21-й день жизни мух. Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM (\*\*  $p < 0,01$ ,  $n = 20$ )

3.15. Активность депо-управляемых каналов, образованных субъединицами Orai, может быть связана с чувствительностью нейронов к окислительному стрессу.

Окислительный стресс - процесс, вовлеченный во многие патологические состояния нервной системы, такие как Болезнь Альцгеймера и Паркинсона, инсульт и травма. Окислительный стресс происходит из-за дисбаланса между производством супероксида в митохондриях и недостаточного уровня инактивации реактивных форм кислорода (ROS). Один из основных путей защиты нейронов от ROS зависит от продукции глутатиона (GSH), трипептида, состоящий из глутамата, цистеина и глицина, в образовании которого участвуют ферменты глутамат-цистеин-лигаза и GSH-синтетаза. В своем восстановленном состоянии GSH служит донором электрона для инактивации ROS и, таким образом, окисляется с образованием GSH-дисульфида. Восстановление GSH из дисульфида опосредуется GSH-редуктазой в реакции с потреблением NADPH (Dringen et al., 2000).

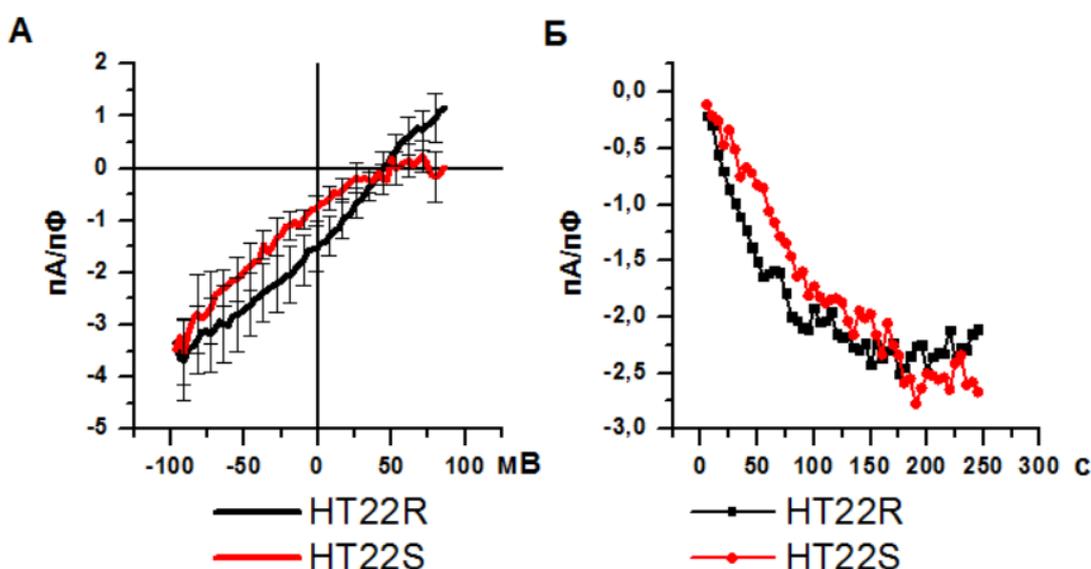


Рисунок 45. Чувствительные (S) и резистентные (R) к окислительному стрессу клетки линии HT22 имеют разные характеристики  $I_{soc}$ . А.

*Вольтамперные характеристики  $I_{SOC}$  в клетках HT22S и HT22R. Данные показаны как среднее  $\pm$  SEM ( $p < 0,05$ ,  $n = 7-9$ )*

Модели с истощением GSH служат для изучения эффектов эндогенного окислительного стресса. В экспериментах *in vitro* обработка нервных клеток глутаматом приводит к ингибированию поглощения цистина через систему антипорта глутамат/цистин. В клетках, цистин быстро превращается в цистеин, который используется для синтеза GSH. Понижение уровня цистина вызывает вторичное истощение GSH и программируемую смерть клетки путем окситоза/ферроптоза (Albrecht et al., 2010; Dixon et al., 2012). Для изучения окситоза/ферроптоза хорошо зарекомендовала себя модельная система глутамат-индуцированной гибели клеток в клеточной линии гиппокампа мыши HT22, которая широко использовалась для изучения сигнального каскада гибели клеток (Albrecht et al., 2010). В процессе программируемой гибели клетки путем окситоза/ферроптоза в таких клетках происходит сильный вход кальция через ПМ. Было обнаружено, что этот вход кальция блокируется фармакологическим агентом 2-APB, который повышает выживаемость клеток при высоких концентрациях глутамата (Henke et al., 2013). Из линии HT22 были выделены две линии HT22S и HT22R, которые отличались своей чувствительностью к окислительному стрессу (S-чувствительные и R-резистентные) (Sahin et al., 2006; Dittmer et al., 2008; Toutzaris et al., 2010; Noack et al., 2012). Было обнаружено, что депо-управляемый вход кальция значительно снижен в резистентных клетках, что, по всей вероятности, связано с меньшим уровнем экспрессии белка Orai1. Снижение экспрессии Orai1 в этих клетках также увеличивал выживаемость чувствительных клеток в условиях высокой концентрации глутамата (Henke et al., 2013). Для того, чтобы подтвердить роль Orai1 в депо-управляемом входе, активируемом при окситозе, были проведены электрофизиологические эксперименты с опустошением кальциевых депо с помощью 1 мкМ Tg в клетках линии HT22S и линии HT22R. Полученные данные

продемонстрировали различия в характеристиках токов депо-управляемого входа кальция в этих двух линиях. Обнаружено, что вольтамперные характеристики токов в клетках NT22R имели линейную форму, характерную для каналов, образованных TRPC, в то время как у линии NT22S они имели форму, характерную для токов  $I_{CRAC}$  и  $Orai1$  (Рисунок 45 А). Остальные характеристики токов не отличались между двумя линиями (Рисунок 45, А, Б). Следовательно, депо-управляемый вход кальция через каналы  $Orai1$  может влиять на чувствительность нейронов к окислительному стрессу. Также полученные данные согласуются с описанной ранее нейропротекторной ролью TRPC1 (Selvaraj et al., 2009). Более того, данные могут служить возможным объяснением положительного эффекта 2-APB для нейронов животных моделей наследственной БА.

## 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Изменения в активности каналов при повышении уровня неразрезанного белка PS1 связаны с уровнем его эндопротеолиза, но не связаны с активностью  $\gamma$ -секретазы и с уровнем A $\beta$ .

Повышение уровня PS1 путем экспрессии PS1 D257A привело к увеличению депо-управляемого входа кальция в клетках мышинных фибробластов MEF DKO с двойным нокаутом PS1 и PS2. Поскольку PS1 D257A не функционирует как субъединица  $\gamma$ -секретазы, а в фибробластах DKO нет эндогенной функциональной  $\gamma$ -секретазы, наблюдаемый эффект не мог быть связан с изменением уровня A $\beta$ . Более того, именно повышенный уровень полноразмерного PS1 был связан с повышением активации депо-управляемых каналов и входа кальция в клетках MEF DKO, клетках Neuro2a и нейронах гиппокампа, что позволяет исключить роль PS2. Эти данные важны для понимания роли PS1 в патологии БА, помимо его участия в расщеплении APP  $\gamma$ -секретазой для образования A $\beta$ . Фактически, наследственная БА не связана с мутациями в других субъединицах  $\gamma$ -секретазы, что указывает на то, что, может быть, не только потеря или изменение функции  $\gamma$ -секретазы отвечает за патогенность мутаций PS1. Важным фактом является также то, что экспрессия PS1 дикого типа не вызывала изменений входа кальция в нейронах и клетках Neuro2a. Это, по-видимому, происходит потому, что уровень эндопротеолиза в случае белка дикого типа был нормальным, как это следует из отношения количества полноразмерного PS1 к его концевому фрагменту. Таким образом, снижение уровня эндопротеолиза PS1 является ключевым фактором, ответственным за наблюдаемое увеличение активации депо-управляемых кальциевых каналов. Также следует отметить, что фармакологическое ингибирование эндопротеолиза нативного мышинового PS1 или экспрессированного человеческого PS1 дикого типа приводило к усилению активации каналов также, как и в экспериментах с PS1 D257A не имеющего ферментативной активности. Принимая во внимание, что

большинство связанных с наследственной БА мутаций в гене белка PS1 являются мутациями с потерей функции (Kim et al., 2008), наблюдаемые эффекты могут быть общими для таких наследственных форм.

4.2. Изменения в активности депо-управляемых каналов может быть связано с патологией наследственной БА.

Растущее количество доказательств указывает на то, что нарушения гомеостаза кальция в нейронах играет роль в патологии при нейродегенеративных заболеваниях. Многие исследования показали, что нарушение гомеостаза кальция является частью клеточной патологии при болезни Альцгеймера (Berridge et al., 2013). Депо-управляемый вход кальция участвует в важных процессах в нейронах: от дифференциации клеток-предшественников нейронов, до роста аксона, высвобождения нейротрансмиттеров, LTP, экспрессии генов, регуляции возбудимости и энергетического метаболизма (Emptage et al., 2001; Baba et al., 2003; Emptage et al., 2001; Baba et al., 2003; Kann et al., 2012; Mitchell et al., 2012; Shim et al., 2013; Somasundaram et al., 2014; Sun et al., 2014). В связи с этим нарушение регуляции депо-управляемых каналов может стать основой патологических процессов, сопровождающих болезнь Альцгеймера. Увеличение депо-управляемого входа кальция было продемонстрировано на лимфоцитах пациентов со спорадической болезнью Альцгеймера (Jaworska et al., 2013). В клеточных моделях БА с экспрессией белков PS1 с пониженной энзиматической активностью и эндопротеолизом, которые приводят к накоплению полноразмерного белка были смоделированы условия, обнаруженные в тканях головного мозга пациентов с БА, имеющих мутации в гене белка PS1. В частности, мутация ΔE9 приводит к потере эндопротеолиза и накоплению полноразмерного белка PS1, также как фармакологическое ингибирование эндопротеолиза или экспрессия белка PS1 D257A с отсутствием ферментативной активности. Вне зависимости от способа увеличения количества полноразмерного белка, в результате в клетках

происходило увеличение депо-управляемого входа кальция. Данные, полученные на трансгенных дрозофилах, также говорят в пользу того, что увеличенная активность депо-управляемых каналов может быть причиной развития патологии при НБА, в частности потери кратковременной памяти. Данные полученные другой группой на трансгенных мышках, экспрессирующих PS1 с той же мутацией, подтверждают, что и в нейронах млекопитающих усиленная активность депо-управляемых каналов может приводить к патологии синаптической пластичности (Hu et al., 2014).

4.3. Сенсор STIM1 является ключевым переносчиком патологического сигнала к депо-управляемым каналам и вызывает их гиперактивацию.

Депо-управляемые каналы регулируются сенсорами кальция STIM, которые передают сигнал от ЭР к кальциевым каналам в ПМ. В результате экспериментов на клеточных моделях БА были обнаружены усиленное перемещение STIM1 к ПМ и увеличенное количество взаимодействующих белков STIM1-Orai1. В тоже время, в клеточных моделях не было обнаружено изменений в экспрессии STIM1. Кроме того, снижение экспрессии STIM1 восстанавливало амплитуду тока  $I_{SOC}$  в нейронах, с экспрессией мутантного человеческого гена PS1  $\Delta E9$ , до контрольных значений. Напротив, снижение экспрессии STIM2 не изменяло амплитуду токов. Эти данные указывают на специфическую роль STIM1 в качестве переносчика патологического сигнала на депо-управляемые каналы.

Интересно, что понижение экспрессии STIM2 меняло форму вольтамперных характеристик тока на характерную для  $I_{CRAC}$ ,  $E_{rev}$  которого находится в значительно более положительных значениях. Это может быть связано с изменениями в регуляции каналов, образованными TRPC. STIM1 и STIM2 могут действовать синергически, если оба активируются в случае опустошения депо сильными рецепторными стимулами. В тоже время STIM2 может работать, как переносчик сигнала, независимо от STIM1 (Brandman et al., 2007). Полученные данные не исключают, что в нормальных нейронах

гиппокампа оба сенсора STIM1 и STIM2 регулируют депо-управляемые каналы. Поскольку перекрестная активность STIM1 и STIM2 в отношении каналов была продемонстрирована ранее (Shalygin et al., 2015), мы предполагаем, что снижение уровня экспрессии STIM1 может быть скомпенсировано активацией STIM2 в контрольных нейронах. Кроме того, возможно, что STIM2 играет более важную роль в регуляции депо-управляемых каналов в гиппокампальных нейронах, поскольку STIM2 экспрессируется в них практически вдвое больше, чем STIM1. Эти данные согласуются с ранее продемонстрированной ролью STIM2 в регуляции депо-управляемого входа кальция в нейроны гиппокампа (Berna-Erro et al., 2009). Ингибитор 2-APB снижает активность депо-управляемых каналов в гиппокампальных нейронах, экспрессирующих мутантный ген человека PS1 ΔE9, понижая амплитуду тока до контрольных значений. Ранее было показано, что 2-APB ингибирует активированный Tg депо-управляемый вход кальция в нейронах, экспрессирующих YFP-STIM1/Orai1, но не оказывает такого же ингибирующего эффекта в нейронах, экспрессирующих YFP-STIM2/Orai1 (Gruszczynska-Biegala et al., 2011). Это наблюдение согласуется с полученными данными, так как патологический депо-управляемый ток был чувствителен к 2-APB, а также к снижению экспрессии STIM1 с помощью shRNA.

STIM1 способен регулировать как каналы, образованные Orai, так и образованные TRPC (Strübing et al., 2003; Asanov et al., 2015). Следовательно, усиление его активации может привести к одновременному усилению активности каналов, образованных как одним, так и другим типом субъединиц.  $E_{rev}$  для токов каналов TRPC составляет не более 20 мВ (Ambudkar et al., 2016; Ong et al., 2016), тогда как  $E_{rev}$  для Orai превышает 50 мВ (DeHaven et al., 2007). В клетках Neuro2a и нейронах гиппокампа мы наблюдали Tg-индуцированную активацию токов с  $E_{rev}$  примерно 35 мВ или 30 мВ. Возможно, что при записи интегрального тока оба типа каналов (TRPC и Orai),

активируются одновременно. При этом другие исследования показывают, что участие и TRPC, и Orai в формировании гетеромерного канала маловероятно (Shalygin et al., 2017). При этом активность TRPC зависит от Orai (Shalygin et al., 2017). Данные полученные на контрольных нейронах и нейронах, моделирующих НБА, в которых было осуществлено снижение экспрессии белков TRPC1 и Orai1, также говорят в пользу того, что каналы, образованные этими белками, работают одновременно в случае нормального и патологического депо-управляемого входа кальция.

4.4. Трансгенные *Drosophila melanogaster* с экспрессией мутантного гена человека PS1 ΔE9 в холинергической нервной системе демонстрируют потерю кратковременной памяти.

*Drosophila melanogaster* имеет только один гомолог dSTIM, который структурно подобен белку STIM человека (Williams et al., 2001) и аналогичным образом регулирует депо-управляемые кальциевые каналы (Roos et al., 2005). Было показано, что депо-управляемые кальциевые каналы играют важную роль в нейронах дрозофилы (Venkiteswaran et al., 2009). Данные полученные на моделях НБА с экспрессией мутантного гена человека PS1 ΔE9 в холинергических нейронах продемонстрировали зависимость от возраста потерю кратковременной памяти. Поскольку ранее было показано, что фармакология депо-управляемых каналов в нейронах дрозофилы сходна с каналами в клетках млекопитающих, 2-APB может использоваться как ингибитор (Wu et al., 2011). Семь дней кормления с 2-APB предотвращали нарушения памяти мух, моделирующих НБА, по сравнению с контрольными группами, употреблявшими обычную пищу или пищу с ДМСО. В целом результаты показывают важную роль депо-управляемых каналов и кальциевого гомеостаза в патологических изменениях памяти у модельных дрозофил. Похожие данные были ранее получены с другой моделью БА на основе дрозофилы: у мух была обнаружена потеря памяти, развивающаяся с возрастом, в связи с экспрессией PS1 с потерей ферментативной активности в

нейронах. Был предложен клеточный механизм, включающий сигнал рецептора IP3R (McBride et al., 2010). Фактически депо-управляемые каналы могут регулироваться IP3R. Более того для нейронов дрозофил было показано, что активность депо-управляемых каналов также оказывает влияние на уровень выброса кальция через IP3R, а dSTIM может компенсировать изменения в кальциевом гомеостазе нейронов при потере функции IP3R (Venkiteswaran et al., 2009; Agrawal et al., 2010). Таким образом, гиперактивация депо-управляемых каналов может быть вовлечена в нарушения памяти, обнаруженные и у этих моделей БА, так как, фактически, вовлечена в один и тот же сигнальный путь. Относительно недавно исследование с трансгенными мышам APP<sup>swe</sup> / PS1 ΔE9 показало, что 2-APB уменьшал дефицит LTP в срезах гиппокампа (Hu et al., 2014). Таким образом, данные полученные на разных моделях свидетельствуют в пользу того, что изменения активности депо-управляемых каналов могут быть вовлечены в потерю памяти при наследственной форме БА.

4.5. Производные 2-APB могут использоваться для разработки новых потенциальных лекарственных препаратов для лечения нейродегенерации при НБА.

Данные с использованием 2-APB в качестве ингибитора патологического входа кальция в клеточных и животных моделях НБА убедительно демонстрируют потенциал этого вещества и его производных для дальнейших разработок потенциальных лекарственных препаратов. Очевидно, что свою активность 2-APB проявляет за счет регуляции клеточного кальциевого гомеостаза. Возможным механизмом действия против нейродегенеративных процессов является снижение чувствительности нейронов к окислительному стрессу (Henke et al., 2013).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, результаты работы показывают, что нарушения регуляции кальциевого гомеостаза действительно играют важное значение в процессах нейродегенерации при НБА. Важным аспектом этих процессов являются нарушения активности депо-управляемых кальциевых каналов, фармакологическое действие на которые, возможно использовать в качестве механизма действия новых препаратов. В качестве молекулярной мишени для разработок может быть использован кальциевый сенсор STIM1, регулирующий активность депо-управляемых кальциевых каналов, и вызывающий их гиперактивацию в случае с патологией НБА, вызванной накоплением полноразмерного PS1. Более того, впервые было продемонстрировано, что кальциевые каналы, участвующие в патологическом входе кальция при НБА, образованы белками Ora1 и TRPC1. Поскольку 2-APB способен предотвращать потерю кратковременной памяти, блокируя активность депо-управляемых кальциевых каналов, то возможно, что производные 2-APB могли бы послужить перспективным предметом дальнейшего исследования, а также разработки лекарств.

## ВЫВОДЫ

1. Экспрессия гена человека с мутацией PS1 DE9, связанной с НБА, в нейронах гиппокампа мышей и нейробластеме мыши линии Neuro2a приводит к увеличению амплитуды депо-управляемого входа кальция.
4. Патологические изменения в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных моделях НБА происходят за счет гиперактивности кальциевых сенсоров STIM1.
3. Изменения в активности депо-управляемых каналов и амплитуде входа кальция в клеточных моделях НБА не связано с изменениями уровня экспрессии основных каналообразующих и регуляторных белков депо-управляемого входа кальция.
4. Патологические изменения в регуляции депо-управляемых кальциевых каналов в клеточных моделях НБА происходят за счет активности кальциевых сенсоров STIM1, передающим патологический сигнал к каналам в плазматической мембране.
5. Белки TRPC1 и Orai1 участвуют в образовании депо-управляемых каналов в нейронах гиппокампа мыши и вовлечены в патологически увеличенный вход кальция в клеточных моделях НБА.
6. Экспрессия мутантного гена человека PS1 DE9 в нейронах холинергической нервной системы трансгенных *Drosophila melanogaster* приводит к возрастным нарушениям кратковременной памяти, что подтверждает фенотипическое проявление НБА в этой модели.
7. Ингибитор депо-управляемых кальциевых каналов 2-APB, действующий на сенсор STIM1, восстанавливает функцию памяти в трансгенных *Drosophila melanogaster*, экспрессирующих мутантный ген человека PS1 DE9 в нейронах холинергической нервной системы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Калын, Я.Б. Деменции альцгеймеровского типа: эпидемиология и факторы риска / Калын Я.Б., Брацун А.Л. // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2001. – Т. 3. – № 2.
2. Abou-Sleiman, P. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease / P. Abou-Sleiman, M. Muqit, W. Wood // *Nat Rev Neurosci* – 2006. – V. 7. – N. 3. – P. 207–219.
3. Adlard, P. Rapid restoration of cognition in Alzheimer's transgenic mice with 8-hydroxy quinoline analogs is associated with decreased interstitial Abeta / P. Adlard, R. Cherny, D. Finkelstein, E. Gautier, E. Robb, M. Cortes, I. Volitakis, X. Liu, J. Smith, K. Laughton, Q. Li, S. Charman, J. Nicolazzo, S. Wilkins, K. Deleva, T. Lynch, G. Kok, C. Ritchie, R. Tanzi, R. Cappai, C. Masters, K. Barnham, A. Bush // *Neuron* – 2008. – V. 59. – N. 1. – P. 43–55.
4. Agrawal, N. Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor and dSTIM Function in *Drosophila* Insulin-Producing Neurons Regulates Systemic Intracellular Calcium Homeostasis and Flight / N. Agrawal, G. Venkiteswaran, S. Sadaf, N. Padmanabhan, S. Banerjee, G. Hasan // *Journal of Neuroscience* – 2010. – V. 30. – N. 4. – C.1301–1313.
5. Ahn, H. Alzheimer's disease peptide  $\beta$ -amyloid interacts with fibrinogen and induces its oligomerization / H. Ahn, D. Zamolodchikov, D. Cortes-Canteli, M., E. Norris, J. Glickman, S. Strickland // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – V. 107. – P. 21812–21817.
6. Albrecht, P. Mechanisms of oxidative glutamate toxicity: the glutamate/cystine antiporter system xc- as a neuroprotective drug target / P. Albrecht // *Mol Disord Drug Targets*. – 2010. – V. 9. – P. 373–382.

7. Ali, S. CRAC channel gating and its modulation by STIM1 and 2-aminoethoxydiphenyl borate / S. Ali, T. Xu, X. Xu // *J Physiol.* – 2017. – V. 595. – N. 10. – P. 3085-3095.
8. Allinson, T. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases / T. Allinson, E. Parkin, A. Turner, N. Hooper // *J Neurosci Res* – 2003. – V. 74. – P. 342–352.
9. Alonso, A. Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules / A. Alonso, I. Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal // *Nat. Med.* – 1996. – V. 2. – P. 783–787.
10. Alonso, A. Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease / A. Alonso, T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal // *Proc. Natl Acad. Sci. USA* – 1994. – V. 91. – P. 5562–5566.
11. Ambudkar, I. TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces / I. Ambudkar, L. de Souza, H. Ong // *Cell Calcium* – 2017. – V. 63. – P. 33-39.
12. Anekonda, T. Calcium channel blocking as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease: the case for isradipine / T. Anekonda, J. Quinn // *Biochim Biophys Acta* – 2011. – V. 1812. – N. 12. – P. 1584-1590.
13. Anstey, K. Alcohol consumption as a risk factor for dementia and cognitive decline: meta-analysis of prospective studies / K. Anstey, H. Mack, N. Cherbuin // *Am J Geriatr Psychiatry* – 2009. – V. 17. – P. 542–555.
14. Arendt, T. Selective cell death of hyperploid neurons in Alzheimer's disease / T. Arendt, M.K. Bruckner., B. Mosch, A. Losche // *A Am. J. Pathol.* – 2010. – V. 177. – P. 15–20.
15. Arioka, M. Tau protein kinase II is involved in the regulation of the normal phosphorylation state of tau protein / M. Arioka, M. Tsukamoto, K. Ishiguro, R. Kato, K. Sato, K. Imahori, T.J. Uchida // *J Neurochem.* – 1993. – V. 60. – P. 461–468

16. Armstrong, R.A. Factors determining disease duration in Alzheimer's disease: A postmortem study of 103 cases using the Kaplan-Meier estimator and Cox regression / R.A. Armstrong // *Biomed Res Int.* – 2014. – 623487.
17. Asanov, A. Combined single channel and single molecule detection identifies subunit composition of STIM1-activated transient receptor potential canonical (TRPC) channels / A. Asanov, A., Sampieri, C. Moreno, J. Pacheco, A. Salgado, R. Sherry, L. Vaca // *Cell Calcium.* – V. 57. – P. 1-13.
18. Ashmole, I. CRACM/Orai ion channel expression and function in human lung mast cells. / I. Ashmole, S.M. Duffy, M.L. Leyland, V.S. Morrison, M. Begg, P. Bradding // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2012. – V. 129. – P. 1628–1635
19. Baba, A. Activity-evoked capacitative Ca<sup>2+</sup> entry: implications in synaptic plasticity / A. Baba, T. Yasui, S. Fujisawa, R.X. Yamada, M.K. Yamada, N. Nishiyama, N. Matsuki, Y. Ikegaya // *J Neurosci* – 2003. – V. 23. – P. 7737-7741
20. Ballard, C. Alzheimer's disease / C. Ballard, S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, E. Jones // *Lancet.* – 2011. – V. 377. – N. 9770. – P. 1019-1031.
21. Basak, J.M. APP-based transgenic models of Alzheimer's dementia: the PDAPP Model / J.M. Basak, D.M. Holtzman // *Animal Models of Dementia.* New York. – 2010. – P. 371–385.
22. Basi, G.S. Amyloid precursor protein selective gamma-secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease / G.S. Basi, S. Hemphill, E. Brigham, A. Liao, D.L. Aubele, J. Baker, R. Barbour, M. Bova, X. Chen, M. Dappen, T. Eichenbaum, E. Goldbach, J. Hawkinson, R. Lawler-Herbold, K. Hu, T. Hui, J.J. Jagodzinski, P.S. Keim, D. Kholodenko, L.H. Latimer, M. Lee, J. Marugg, M.N. Mattson, S. McCauley, J.L. Miller, R. Motter, L. Mutter, M.L. Neitzel, H. Ni, L. Nguyen, K. Quinn, L. Ruslim, C.M. Semko, P. Shapiro, J. Smith, F. Soriano, B. Szoke, K. Tanaka, P. Tang, J.A. Tucker, X.M. Ye, M. Yu, J. Wu, Y.Z. Xu, A.W. Garofalo, J.M. Sauer, A.W. Konradi, D. Ness, G. Shopp, M.A.

- Pleiss, S.B. Freedman, D. Schenk // *Alzheimers Res Ther.* – 2010. - V. 2. – N. 6. – P. 36.
23. Baudier, J. Interactions between the microtubule-associated tau proteins and S100b regulate tau phosphorylation by the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II / J. Baudier, R. D. Cole // *J. Biol. Chem.* – 1988. – V. 263. – P. 5876–5883.
24. Bekris, L.M. Genetics of Alzheimer disease / L.M. Bekris, C.E. Yu, T.D. Bird, D.W. Tsuang // *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* – 2010. – V. 23. – P. 213-227.
25. Bell, R.D. Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin / R.D. Bell, E.A. Winkler, I. Singh, A.P. Sagare, R. Deane, Z. Wu, D.M. Holtzman, C. Betsholtz, A. Armulik, J. Sallstrom, B.C. Berk, B.V. Zlokovic // *Nature* – 2012. – V. 485. – P. 512–516
26. Benilova, E. The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes / E. Benilova, Karran, B. De Strooper // *Nat. Neurosci.* – 2012. – V. 15. – P. 349–359
27. Bennefib, M. Role of protein phosphatase-2A and -1 in the regulation of GSK-3, cdk5 and cdc2 and the phosphorylation of tau in rat forebrain / M. Bennefib, C. X. Gong, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal // *FEBS Lett.* – 2000. V. 485. – P. 87–93.
28. Bentahir, M. Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms / M. Bentahir, O., Nyabi, J. Verhamme, A. Tolia., K. Horre, J. Wiltfang, H. Esselmann, B. De Strooper // *Journal of Neurochem.* – 2006. – V. 96. – P. 732–742
29. Berna-Erro, A. TIM2 regulates capacitive Ca<sup>2+</sup> entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death / A. Berna-Erro, A. Braun, R. Kraft, C. Kleinschmitz, M.K. Schuhmann, D. Stegner, T. Wulfsch, J. Eilers, S.G. Meuth, G. Stoll, B. Nieswandt // *Sci Signal.* – 2009. – V. 2. – ra67.
30. Berridge, M.J. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease / M.J. Berridge // *Pflugers Arch.* – 2010. – V. 459. – N. 3. – P. 441-449.

31. Beydoun, M.A. Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: A systematic review and meta-analysis / M.A. Beydoun // *Obes. Rev.* – 2008. – V. 9. - P. 204–218.
32. Bezprozvanny, I. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease / I. Bezprozvanny, M. Mattson // *Trends Neurosci.* – 2008. – V. 31. – P. 454–463.
33. Boeras, D.I. Alzheimer's presenilin 1 causes chromosome missegregation and aneuploidy / D.I. Boeras, A. Granic, J. Padmanabhan, N.C. Crespo, A.M. Rojiani, H. Potter // *Neurobiology of Aging* – 2008. – P. 319–328.
34. Bojarski, L. Presenilin-dependent expression of STIM proteins and dysregulation of capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in familial Alzheimer's disease / L. Bojarski, P. Pomorski, A. Szybinska, M. Drab, A. Skibinska-Kijek, J. Gruszczynska-Biegala, J. Kuznicki // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* – 2009. – V. 1793. – N. 6. – P.1050-1057
35. Bolduc, F.V. Excess protein synthesis in *Drosophila* Fragile X mutants impairs long-term memory / F.V. Bolduc, K. Bell, H. Cox, K.S. Broadie, T. Tully // *Nature Neuroscience* – 2008. – V. 11. – P. 1143–1145.
36. Bootman, M.D. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry but an inconsistent inhibitor of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. / M.D. Bootman, T.J. Collins, L. Mackenzie, H.L. Roderick, M.J. Berridge, C.M. Peppiatt // *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* – 2002. – V. 16. – N. 10. – P. 1145–1150.
37. Borghi, R. Upregulation of presenilin 1 in brains of sporadic, late-onset Alzheimer's disease / R. Borghi, A. Piccini, E. Barini, G. Cirmena, M. Guglielmotto, E. Tamagno, M. Fornaro, G. Perry, M.A. Smith, A. Garuti, M. Tabaton // *J. Alzheimers Dis.* – 2010. – V. 22. – P. 771–775.
38. Boutajangout, A. Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline in a New Tangle Mouse Model / A. Boutajangout, D.

- Quartermain, E.M. Sigurdsson // *Journal of Neuroscience* – 2010. –V. 30. – N. 49. – P. 16559-16566.
- 39.Boyle, J.P. Cellular consequences of the expression of Alzheimer's disease-causing presenilin 1 mutations in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells / J.P. Boyle, N.T. Hettiarachchi, J.A. Wilkinson, H.A. Pearson, J.L. Scragg, C. Lendon, M.M. Al-Owais, C.B. Kim, D.M. Myers, P. Warburton, C. Peers // *Brain Res.* – 2012. – V. 1443. – P. 75-88.
- 40.Brand, A.H. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. / A.H. Brand, N. Perrimon // *Development* (Cambridge, England) – 1993. – V. 118. – P. 401–415.
- 41.Brandman, O. STIM2 Is a Feedback Regulator that Stabilizes Basal Cytosolic and Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> Levels / O. Brandman, J. Liou, W.S. Park, T. Meyer // *Cell* – 2007. – V. 1327. – e1339.
- 42.Brody, D.L. Active and passive immunotherapy for Neurodegenerative disorders / D.L Brody., D.M. Holtzman. // *Annual Review of Neuroscience* – 2008. – V. 31. – P. 175-193.
- 43.Brouwers, N. Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites / N. Brouwers, C. Cauwenberghe, S. Engelborghs, J.-C. Lambert, K. Bettens, N. Le Bastard, F. Pasquier, A.G. Montoya, K. Peeters, M. Mattheijssens, R. Vandenberghe, P.P. De Deyn, M. Cruts, P. Amouyel, K. Sleegers, C. Van Broeckhoven // *Molecular Psychiatry* – 2012. – V. 17. – P. 223–233.
- 44.Bucholtz, N. DNA-repair in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease / Bucholtz N., Demuth I. // *DNA Repair* – 2013. – V. 12. – P. 811–816.
- 45.Bugaj, V. Functional properties of endogenous receptor- and store-operated calcium influx channels in HEK293 cells / V. Bugaj, V. Alexeenko, A. Zubov, L. Glushankova, A. Nikolaev, Z. Wang, E. Kaznacheyeva, I. Bezprozvanny, G.N. Mozhayeva // *Journal of Biological Chemistry* – 2005. – 280. – N. 17. – P. 16790-16797.

46. Burgess, A. Alzheimer Disease in a Mouse Model: MR Imaging-guided Focused Ultrasound Targeted to the Hippocampus Opens the Blood-Brain Barrier and Improves Pathologic Abnormalities and Behavior / A. Burgess, S. Dubey, S. Yeung, O. Hough, N. Eterman, I. Aubert, K. Hynynen // *Radiology* – 2014. – V. 273. – N. 3. – P. 736-745.
47. Busser, J. Ectopic Cell Cycle Proteins Predict the Sites of Neuronal Cell Death in Alzheimer's Disease Brain / J. Busser, D.S. Geldmacher, K. Herrup // *J. Neurosci.* – 1998. – V. 18. – P. 2801–2807.
48. Cairns, N.J. Neuropathologic assessment of participants in two multi-center longitudinal observational studies: The Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) and the Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN) / N.J. Cairns, R.J. Perrin, E.E. Franklin, D. Carter, B. Vincent, M. Xie, R.J. Bateman, T. Benzinger, K. Friedrichsen, W.S. Brooks, G.M. Halliday, C. Mclean, B. Ghetti, J.C. Morris // *Neuropathology* – 2015. – V. 35. – P. 390-400.
49. Calvo-Rodríguez, M. In vitro aging promotes endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria Ca<sup>2+</sup> cross talk and loss of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) in rat hippocampal neurons / M. García-Durillo, C. Villalobos, L. Núñez // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* – 2016. – V. 1863. – N. 11. – P. 2637-2649.
50. Cameron, B. Inflammation, microglia, and alzheimer's disease / B. Cameron // *Neurobiol. Dis.* – 2010. – V. 37. – P. 503–509.
51. Canugovi, C. The role of DNA repair in brain related disease pathology / Canugovi C., Misiak M., Ferrarelli L.K., Croteau D.L., Bohr V.A. // *DNA Repair* – 2013. – V. 12. – P. 578–587.
52. Carmine-Simmen, K. Neurotoxic effects induced by the Drosophila amyloid-beta peptide suggest a conserved toxic function / Carmine-Simmen K., Proctor T., Tschäpe J., Poeck B., Triphan T., Strauss R., Kretzschmar D. // *Neurobiology of Disease* – 2009. – V. 33. P. 274–281.

53. Castellano, J.M. Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- Peptide Clearance / Castellano J.M., Kim J., Stewart F.R., Jiang H., DeMattos R.B., Patterson B.W., Fagan A.M., Morris J.C., Mawuenyega K.G., Cruchaga C., Goate A.M., Bales K.R., Paul S.M., Bateman R.J., Holtzman D.M. // *Science Translational Medicine* – 2011. – 89ra57.
54. Chai, X. Passive immunization with anti-tau antibodies in two transgenic models: Reduction of tau pathology and delay of disease progression / X. Chai, S. Wu, T.K. Murray, R. Kinley, C.V. Cella, H. Sims, N. Buckner, J. Hanmer, P. Davies, M.J. O’Neill, M.L. Hutton, M. Citron // *Journal of Biological Chemistry* – 2011. – V. 286. – N. 39. – P. 34457-34467.
55. Chakraborty, R. Characterization of a drosophila Alzheimer’s disease model: Pharmacological rescue of cognitive defects / R. Chakraborty, V. Vepuri, S.D. Mhatre, B.E. Paddock, S. Miller, S.J. Michelson, R. Delvadia, A. Desai, M. Vinokur, D.J. Melicharek, S. Utreja, P. Khandelwal, S. Ansaloni S., L.E. Goldstein, R.D. Moir, J.C. Lee, L.P. Tabb, A.J. Saunders, D.R. Marena // *PLoS ONE* – 2011. V. 6. – e20799
56. Chakraborty, S. Deviant ryanodine receptor-mediated calcium release resets synaptic homeostasis in presymptomatic 3xTg-AD mice. / S. Chakraborty, I. Goussakov, M.B. Miller, G.E. Stutzmann // *The Journal of Neuroscience* – 2009. – V. 29. – P. 9458–9470.
57. Chapuis, J. Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology / J. Chapuis, F. Hansmannel, M. Gistelincq, A. Mounier, C. Van Cauwenberghe, K.V. Kolen, F. Geller, Y. Sottejeau, D. Harold, P. Dourlen, B. Grenier-Boley, Y. Kamatani, B. Delepine, F. Demiautte, D. Zelenika, N. Zommer, M. Hamdane, C. Bellenguez, J.-F. Dartigues, J.-J. Hauw, F. Letronne, A.-M. Ayril, K. Sleegers, A. Schellens, L. Broeck, S. Engelborghs, P.P. De Deyn De, R. Vandenberghe, O’Donovan M., Owen M., Epelbaum J., Mercken M., Karran E., Bantscheff M., G. Drewes, G. Joberty, D. Champion, J.-N. Octave, C. Berr, M. Lathrop, P. Callaerts, D. Mann, J. Williams, L. Buée, I. Dewachter, C. Van Broeckhoven,

- P. Amouyel, D. Moechars, B. Dermaut, J.-C. Lambert // *Molecular Psychiatry* – 2013. – V. 18. – P. 1225–1234.
58. Chasseigneaux, S. Functions of A $\beta$ , sAPP $\alpha$  and sAPP $\beta$ : Similarities and differences / Chasseigneaux S. // *J. Neurochem.* – 2012. – V. 120. – P. 99-108.
59. Chauvet, S. Pharmacological characterization of the native store-operated calcium channels of cortical neurons from embryonic mouse brain / S. Chauvet, L. Jarvis, M. Chevallet, N. Shrestha, K. Groschner, A. Bouron // *Frontiers in Pharmacology* – 2016. – V. 12. – N. 7. – P. 486.
60. Check, E. Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug / E. Check // *Nature.* – 2002. - V. 415. – N. 6871. – P. 462.
61. Chen, G. Characterization of a novel CRAC inhibitor that potently blocks human T cell activation and effector functions / G. Chen, S. Panicker, K.Y. Lau, S. Apparsundaram, V.A. Patel, S.L. Chen, R. Soto, J.K.C. Jung, Ravindran P., Okuhara D., Bohnert G., Che Q., Rao P.E., Allard J.D., Badi L., Bitter H.M., Nunn P.A., Narula S.K., DeMartino J.A. // *Molecular Immunology* – 2013. – V. 54. – P. 355–367.
62. Chen, Y.W. TH1 and TH2 cytokine inhibition by 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazoles, a novel class of immunomodulators / Chen Y.W., Smith M.L., Chiou G.X., Ballaron S., Sheets M.P., Gubbins E., Warrior U., Wilkins J., Surowy C., Nakane M., Carter G.W., Trevillyan J.M., Mollison K., Djuric S.W. // *Cellular Immunology* – 2002. – V. 220. – N. 2. – P. 134–142.
63. Chen, A.C. Aph-1 associates directly with full-length and C-terminal fragments of  $\gamma$ -secretase substrates / Chen A.C., Guo L.Y., Ostaszewski B.L., Selkoe D.J., LaVoie M.J. // *Journal of Biological Chemistry* – 2010. – V. 285. – P. 11378 – 11391.
64. Chen, T. Homer1 knockdown protects dopamine neurons through regulating calcium homeostasis in an in vitro model of Parkinson's disease / Chen T.,

- Yang Y.F., Luo P., Liu W., Dai S.H., Zheng X.R., Fei Z., Jiang X.F. // *Cell Signal.* – 2013a. – V. 25. – N. 12. – P. 2863-2870
- 65.Chen, T. Protective effects of SKF-96365, a non-specific inhibitor of SOCE, against MPP<sup>+</sup>-induced cytotoxicity in PC12 cells: potential role of Homer1 / Chen T., Zhu T. J., Zhang C., Huo K., Fei Z., Jiang X.F. // *PLoS One.* – 2013b. – V. 8. – N. 1. – e55601.
- 66.Cheng, K.T. Local Ca<sup>2+</sup> entry via Orail regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals required for specific cell functions / Cheng K.T., Liu X., Ong H.L., Swaim W., Ambudkar I.S. // *PLoS Biology* – 2011. – V. 9. – P. e1001025.
- 67.Cheng, K.T. Contribution and Regulation of TRPC Channels in Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry / Cheng K.T., Ong H.L., Liu X., Ambudkar I.S. // *Current Topics in Membranes* – 2013. – V. 71. – P. 149-179.
- 68.Cheung, K.-H. Gain-of-Function Enhancement of IP3 Receptor Modal Gating by Familial Alzheimer's Disease-Linked Presenilin Mutants in Human Cells and Mouse Neurons / Cheung K.-H., Mei L., Mak D.-O.D., Hayashi I., Iwatsubo T., Kang D.E., Foskett J.K. // *Science Signaling* – 2010. – V. 114. – ra22.
- 69.Chiba, K. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase / Chiba K., Trevor A., Castagnoli N. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 1984. – N. 2. – P. 574–578.
- 70.Choi, C.H. Age-dependent cognitive impairment in a Drosophila Fragile X model and its pharmacological rescue / Choi C.H., McBride S.M.J., Schoenfeld B.P., Liebelt D.A., Ferreira D., Ferrick N.J., Hinchey P., Kollaros M., Rudominer R.L., Terlizzi A.M., Koenigsberg E., Wang Y., Sumida A., Nguyen H.T., Bell A.J., McDonald T. V., Jongens T.A. // *Biogerontology* – 2010. – V. 11. – P. 347–362.
- 71.Cholerton, B. Insulin, cognition, and dementia // *Eur. J. Pharmacol.* – 2013. – V. 719. – P. 170–179.

- 72.Chong, S.A. Synaptic dysfunction in hippocampus of transgenic mouse models of Alzheimer's disease: A multi-electrode array study / Chong S.A., Benilova I., Shaban H., Strooper B. De, Devijver H., Moechars D., Eberle W., Bartic C., Leuven F. Van, Callewaert G. // *Neurobiology of Disease* – 2011. – V. 44. – P. 284–291.
- 73.Chouraki, V. Genetics of Alzheimer's disease / V. Chouraki, S. Seshadri // *Adv Genet.* – 2014. – V. 87. – P. 245-94.
- 74.Chung, S.C. Inhibition by SK&F 96365 of Ca<sup>2+</sup> current, IL-2 production and activation in T lymphocytes / Chung S.C., McDonald T. V., Gardner P. // *British Journal of Pharmacology* – 1994. – V. 113. – N. 3. – P. 861–868.
- 75.Clavaguera, F. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain / Clavaguera F., Bolmont T., Crowther R.A., Abramowski D., Frank S., Probst A., Fraser G., Stalder A.K., Beibel M., Staufenbiel M., Jucker M., Goedert M., Tolnay M. // *Nature Cell Biology* – 2009. – V. 11. – P. 909–913.
76. Coon, K.D. A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease / Coon K.D., Myers A.J., Craig D.W., Webster J.A., Pearson J. V., Lince D.H., Zismann V.L., Beach T.G., Leung D., Bryden L., Halperin R.F., Marlowe L., Kaleem M., Walker D.G., Ravid R., Heward C.B., Rogers J., Papassotiropoulos A., Reiman E.M., Hardy J., Stephan D.A. // *Journal of Clinical Psychiatry* – 2007. – V. 68. – N. 4. – P. 613–618.
- 77.Coppede, F. DNA damage and repair in Alzheimer's disease / Coppede F., Migliore L. // *Curr Alzheimer Res* – 2009. – V. 6. – P. 36–47.
- 78.Cotman, C.W. Mechanisms of neuronal death in Alzheimer's disease / Cotman C.W., Su J.H. // *Brain Pathol* – 1996. – V. 6. – P. 493–506.
- 79.Counts, S.E. The regulation of presenilin-1 by nerve growth factor / Counts S.E., Lah J.J., Levey A.I. // *Journal of Neurochemistry* – 2001. – V. 76. – P. 679–689.

80. Crowther, R.A. Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 2288–2292.
81. Cruchaga, C. Rare coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease. / Cruchaga C., Karch C.M.C., Jin S.S.C., Goate A.M. // *Nature* – 2014. – V. 505. – P. 550–554.
82. Cruts, M. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases / M. Cruts, J. Theuns, C. Van Broeckhoven // *Human Mutation*. – 2012. – V. 33. – P. 1340-1344.
83. Cuyvers, E. Mutations in ABCA7 in a Belgian cohort of Alzheimer's disease patients: A targeted resequencing study / Cuyvers E., Roeck A. De, Bossche T. Van den, Cauwenberghe C. Van, Bettens K., Vermeulen S., Mattheijssens M., Peeters K., Engelborghs S., Vandenbulcke M., Vandenberghe R., Deyn P.P. De, Broeckhoven C. Van, Sleegers K. // *The Lancet Neurology* – 2015. – V. 14. – P. 814–822
84. Czeredys, M. Tetrahydrocarbazoles decrease elevated SOCE in medium spiny neurons from transgenic YAC128 mice, a model of Huntington's disease / Czeredys M, Maciag F, Methner A, Kuznicki J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – V. 483. – N. 4. – P. 1194-1205.
85. Dauer, W. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models / Dauer, W. Przedborski S. // *Neuron* – 2003. – V. 39. – N. 6. – P. 889–909
86. de Calignon, A. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease / de Calignon A., Polydoro M., Suárez-Calvet M., William C., Adamowicz D.H., Kopeikina K.J., Pitstick R., Sahara N., Ashe K.H., Carlson G. a, Spires-Jones T.L., Hyman B.T. // *Neuron* – 2012. – V. 73. – P. 685–697.
87. Strooper, B. De The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. / Strooper B. De, Karran E., Allen N.J., Zlokovic B.V. // *Cell* – 2016. – V. 164. – N. 4: P. 603–615.
88. Deacon, R.M.J. APP-based transgenic models: The Tg2576 model / Deacon R.M.J. // *Neuromethods* – 2011. – P. 387–398.

89. Deane, R. A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid  $\beta$ -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease / Deane R., Singh I., Sagare A.P., Bell R.D., Ross N.T., LaRue B., Love R., Perry S., Paquette N., Deane R.J., Thiyagarajan M., Zarcone T., Fritz G., Friedman A.E., Miller B.L., Zlokovic B. V. // *Journal of Clinical Investigation* – 2012. – V. 122. – P. 1377–1392
90. Dam, D. Van. Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease / Dam D. Van, Deyn P.P. De // *Br.J Pharmacol.* – 2011. – V. 164. – N. 4. – P. 1285–1300.
91. DeHaven, W.I. Complex actions of 2-aminoethyldiphenyl borate on store-operated calcium entry / DeHaven W.I., Smyth J.T., Boyles R.R., Bird G.S., Putney J.W. // *Journal of Biological Chemistry* – 2008. – V. 283. – N. 28. – P. 19265– 19273.
92. DeHaven, W.I. Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels / DeHaven W.I., Smyth J.T., Boyles R.R., Putney J.W. // *Journal of Biological Chemistry* – 2007. – V. 282. – P. 17548-17556.
93. DeJaegere, T. Deficiency of Aph1B/C- -secretase disturbs Nrg1 cleavage and sensorimotor gating that can be reversed with antipsychotic treatment / DeJaegere T., Serneels L., Schafer M.K., Biervliet J. Van, Horre K., Depboylu C., Alvarez-Fischer D., Herreman A., Willem M., Haass C., Hoglinger G.U., D'Hooge R., Strooper B. De // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2008. – V. 105. – P. 9775–9780.
94. Delacourte, A. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. / Delacourte A., David J.P., Sergeant N., Buée L., Wattez A., Vermersch P., Ghazali F., Fallet-Bianco C., Pasquier F., Lebert F., Petit H., Menza C. Di // *Neurology* – 1999. – V. 52. – P. 1158–1165.
95. Demuro, A. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 12463-12468.

96. Derler, I. The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry / Derler I., Schindl R., Fritsch R., Heftberger P., Riedl M.C., Begg M., House D., Romanin C. // *Cell Calcium* – 2013. – V. 53. – N. 2. – P. 139–151.
97. Di Giorgio, F.P. Non-cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell-based ALS model / Giorgio F.P. Di, Carrasco M.A., Siao M.C., Maniatis T., Eggan K. // *Nature Neuroscience* – 2007. – V. 10. – P. 608–614.
98. Sabatino, A. Di Targeting Gut T Cell Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup> Channels Inhibits T Cell Cytokine Production and T-Box Transcription Factor T-Bet in Inflammatory Bowel Disease / Sabatino A. Di, Rovedatti L., Kaur R., Spencer J.P., Brown J.T., Morisset V.D., Biancheri P., Leakey N.A.B., Wilde J.I., Scott L., Corazza G.R., Lee K., Sengupta N., Knowles C.H., Gunthorpe M.J., McLean P.G., MacDonald T.T., Kruidenier L. // *The Journal of Immunology* – 2009. – V. 183. – N. 5. – P. 3454–3462.
99. Dittmer, S. The constitutively active orphan G-protein-coupled receptor GPR39 protects from cell death by increasing secretion of pigment epithelium-derived growth factor / Dittmer S., Sahin M., Pantlen A., Saxena A., Toutzaris D., Pina A.L., Geerts A., Golz S., Methner A. // *Journal of Biological Chemistry* – 2008. – V. 283. – P. 7074–7081.
100. Dixon, S.J. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death / Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M., Gleason C.E., Patel D.N., Bauer A.J., Cantley A.M., Yang W.S., Morrison B., Stockwell B.R. // *Cell* – 2012. – V. 149. – P. 1060–1072.
101. Djuric, S.W. 3,5-Bis(trifluoromethyl)pyrazoles: A novel class of NFAT transcription factor regulator / Djuric S.W., Wiedeman P.E., Zhou X., Ballaron S., Bauch J., Chen Y.W., Chiou X.G., Fey T., Gauvin D., Gubbins E., Hsieh G.C., Bamaung N.Y., Marsh K.C., Mollison K.W., Pong M., Shaughnessy T.K., Sheets M.P., Smith M., Trevillyan J.M., Warrior U., Wegner C.D., Carter G.W., Basha A., Liu H., Luly J.R., Madar D.J., Sciotti

- R.J., Tu N.P., Wagenaar F.L. // *Journal of Medicinal Chemistry* – 2000. V. 43. – N. 16. – P. 2975–2981.
102. Dolev, I. Spike bursts increase amyloid- $\beta$  40/42 ratio by inducing a presenilin-1 conformational change / Dolev I., Fogel H., Milshtein H., Berdichevsky Y., Lipstein N., Brose N., Gazit N., Slutsky I. // *Nature Neuroscience* – 2013. – V. 16. – N. 5. – P. 587-595.
103. Drewes, G. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. / Drewes G., Ebneith A., Preuss U., Mandelkow E.M., Mandelkow E. // *Cell* – 1997. – V. 89. – P. 297–308.
104. Dringen, R. Glutathione metabolism in brain / Dringen R., Gutterer J.M., Hirrlinger J. // *European Journal of Biochemistry* – 2000. – V. 62. – P. 649–671.
105. Dubois, B. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease : revising the NINCDS – ADRDA criteria / Dubois B., Feldman H.H., Jacova C., Dekosky S.T., Barberger-gateau P., Cummings J., Delacourte A., Galasko D., Gauthier S., Jicha G., Meguro K., Brien J.O., Pasquier F., Robert P., Rossor M., Salloway S., Stern Y., Visser P.J., Scheltens P., Pierre U., Paris C., Victor U., Bordeaux S. // *Lancet Neurology* – 2007. – V. 6. – P. 734–746.
106. Duyckaerts, C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease // *Acta Neuropathol.* – 2009. – V. 118. – P. 5–36.
107. Ejima, A. Sequential learning of pheromonal cues modulates memory consolidation in trainer-specific associative courtship conditioning / Ejima A., Smith B.P.C., Lucas C., Levine J.D., Griffith L.C. // *Current Biology* – 2005. – V.15. – P. 194 –206.
108. Ejima, A. Generalization of Courtship Learning in *Drosophila* Is Mediated by cis-Vaccenyl Acetate / Ejima A., Smith B.P.C., Lucas C., Goes van Naters W. van der, Miller C.J., Carlson J.R., Levine J.D., Griffith L.C. // *Current Biology* – 2007. – V. 17. – P. 599–605.

109. Elder, G.A. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease // Mt. Sinai J. Med. – 2010. – V. 77. – N. 1. – P. 69-81.
110. Emilsson, L. Alzheimer's disease: MRNA expression profiles of multiple patients show alterations of genes involved with calcium signaling / Emilsson L., Saetre P., Jazin E. // Neurobiology of Disease – 2006. – V. 21. – P. 618–625
111. Emptage, N.J. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and spontaneous transmitter release / Emptage N.J., Reid C.A., Fine A. // Neuron – 2001. – V. 29. – P. 197-208.
112. Esparza, T.J. Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls / Esparza T.J., Zhao H., Cirrito J.R., Cairns N.J., Bateman R.J., Holtzman D.M., Brody D.L. // Annals of Neurology – 2013. – V. 73. – P. 104–119.
113. Fahrenholz, F. Alpha-secretase activation--an approach to Alzheimer's disease therapy / F. Fahrenholz, R. Postina // Neuro-degenerative diseases – 2006. – V. 3. – P. 255-261.
114. Fahrner, M. A coiled-coil clamp controls both conformation and clustering of stromal interaction molecule 1 (STIM1) / Fahrner M., Muik M., Schindl R., Butorac C., Stathopoulos P., Zheng L., Jardi I., Ikura M., Romanin C. // Journal of Biological Chemistry – 2014. – V. 10. – P. 33231–33244.
115. Fenili, D. Properties of scyllo-inositol as a therapeutic treatment of AD-like pathology / Fenili D., Brown M., Rappaport R., McLaurin J. // Journal of Molecular Medicine – 2007. – V. 85. – N. 6. – P. 603-11.
116. Ferreira, A. Selective phosphorylation of adult tau isoforms in mature hippocampal neurons exposed to fibrillar A beta. / Ferreira a, Lu Q., Orecchio L., Kosik K.S. // Molecular and cellular neurosciences – 1997. – V. 9. – P. 220–234.

117. Ferreira, S.T. Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. / Ferreira S.T., Clarke J.R., Bomfim T.R., Felice F.G. De // *Alzheimers. Dement.* – 2014. – V. 10. – P. 76–83.
118. Forlenza, O. V Disease-modifying properties of long-term lithium treatment for amnesic mild cognitive impairment: randomised controlled trial / Forlenza O. V, Diniz B.S., Radanovic M., Santos F.S., Talib L.L., Gattaz W.F. // *Br J Psychiatry* – 2011. – V. 198. – N. 5. – P. 351-6.
119. Fraering, P.C. Detergent-Dependent Dissociation of Active  $\gamma$ -Secretase Reveals an Interaction between Pen-2 and PS1-NTF and Offers a Model for Subunit Organization within the Complex / Fraering P.C., LaVoie M.J., Ye W., Ostaszewski B.L., Kimberly W.T., Selkoe D.J., Wolfe M.S. // *Biochemistry* – 2004. – V. 43. – P. 323 – 333..
120. Franzius, D. Non-specific effects of calcium entry antagonists in mast cells / Franzius D., Hoth M., Penner R. // *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* – 1994. – V. 428. – N. 5. – P. 433–438.
121. Frischauf, I. Molecular determinants of the coupling between STIM1 and Orai channels: Differential activation of Orai1-3 channels by a STIM1 coiled-coil mutant / Frischauf I., Muik M., Derler I., Bergsmann J., Fahmer M., Schindl R., Groschner K., Romanin C. // *Journal of Biological Chemistry* – 2009. – V. 284. – P. 21696–21706.
122. Frontzek, K. Amyloid- $\beta$  pathology and cerebral amyloid angiopathy are frequent in iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dural grafting / Frontzek K., Lutz M.I., Aguzzi A., Kovacs G.G., Budka H. // *Swiss medical weekly* – 2016. – V. 146. – w14287.
123. Fukumori, A. Three-amino acid spacing of presenilin endoproteolysis suggests a general stepwise cleavage of gamma-secretase-mediated intramembrane proteolysis / A. Fukumori, R. Fluhner, H. Steiner, C. Haass // *J. Neurosci.* – V. 30. – P. 7853 – 7862.

124. Galimberti, D. Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease / D. Galimberti, E. Scarpini // *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* – 2011. – V. 4. – N. 4. – P. 203-216.
125. Games, D. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F  $\beta$ -amyloid precursor protein / Games D., Adams D., Alessandrini R., Barbour R., Borthellette P., Blackwell C., Carr T., Clemens J., Donaldson T., Gillespie F., Guido T., Hagopian S., Johnson-Wood K., Khan K., Lee M., Leibowitz P., Lieberburg I., Little S., Masliah E., McConlogue L., Montoya-Zavala M., Mucke L., Paganini L., Penniman E., Power M., Schenk D., Seubert P., Snyder B., Soriano F., Tan H., Vitale J., Wadsworth S., Wolozin B., Zhao J. // *Nature* – 1995. – V. 373. – P. 523–527.
126. Garcia-Alvarez, G. STIM2 regulates PKA-dependent phosphorylation and trafficking of AMPARs. / Garcia-Alvarez G., Lu B., Yap K.A.F., Wong L.C., Thevathasan J.V., Lim L., Ji F., Tan K.W., Mancuso J.J., Tang W., Poon S.Y., Augustine G.J., Fivaz M. // *Molecular biology of the cell* – 2015. – V. 26. – N. 6. – P. 1141-1159.
127. Garcia-Alvarez, G. Impaired spatial memory and enhanced long-term potentiation in mice with forebrain-specific ablation of the Stim genes / Garcia-Alvarez G., Shetty M.S., Lu B., Yap K.A.F., Oh-Hora M., Sajikumar S., Bichler Z., Fivaz M. // *Frontiers in Behavioral Neuroscience* – 2015. – V. 9. – P. 180.
128. Gauthier, S. Effect of tramiprosate in patients with mild-to-moderate Alzheimer's disease: Exploratory analyses of the MRI sub-group of the Alphase study / Gauthier S., Aisen P.S., Ferris S.H., Saumier D., Duong A., Haine D., Garceau D., Suhy J., Oh J., Lau W., Sampalis J. // *Journal of Nutrition, Health and Aging* – 2009. – V. 13. – N. 6. – P. 550-7.
129. Genin, E. Apoe and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance / Genin E., Hannequin D., Wallon D., Slegers K., Hiltunen M., Combarros O., Bullido M.J., Engelborghs S., Deyn P. De, Berr C., Pasquier F., Dubois B., Tognoni G., Fiévet N., Brouwers N., Bettens K.,

- Arosio B., Coto E., Zompo M. Del, Mateo I., Epelbaum J., Frank-Garcia A., Helisalmi S., Porcellini E., Pilotto A., Forti P. // *Mol Psychiatry* – 2011. – V. 16. – P. 903–907
130. Georgakopoulos, A. Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts. / Georgakopoulos a, Marambaud P., Efthimiopoulos S., Shioi J., Cui W., Li H.C., Schütte M., Gordon R., Holstein G.R., Martinelli G., Mehta P., Friedrich V.L., Robakis N.K. // *Molecular cell* – 1999. – V. 4. – P. 893–902.
131. Geula, C. Cortical cholinergic fibers in aging and Alzheimer's disease: A morphometric study / Geula C., Mesulam M.M. // *Neuroscience* – 1989. – V. 33. – P. 469–481
132. Ghosh, A.K. Developing beta-secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease / Ghosh A.K., Brindisi M., Tang J. // *J Neurochem* – 2011. – V. 120. – P. 71-83.
133. Giaccone, G. Down patients: Extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques / Giaccone G., Tagliavini F., Linoli G., Bouras C., Frigerio L., Frangione B., Bugiani O. // *Neuroscience Letters* – 1989. – V. 97. – P. 232–238.
134. Gilman, S. Clinical effects of A $\beta$  immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial / Gilman S., Koller M., Black R.S., Jenkins L., Griffith S.G., Fox N.C., Eisner L., Kirby L., Boada Rovira M., Forette F., Orgogozo J.M. // *Neurology* – 2005. – V. 64. – N. 9. – P. 1553-1562.
135. Glenner, G.G. Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein / Glenner G.G., Wong C.W. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 1984. – V. 122. – P. 1131–1135.
136. Glitsch, M.D. Store-operated Ca $^{2+}$  entry depends on mitochondrial Ca $^{2+}$  uptake / M.D. Glitsch, D. Bakowski, A.B. Parekh // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – N. 24. – P. 6744–6754.

137. Goedert, M. A century of Alzheimer's disease / M. Goedert, M.G. Spillantini // *Science*. – 2006. – V. 314. – P. 777–781.
138. Goedert, M. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain / Goedert M., Spillantini M.G., Potier M.C., Ulrich J., Crowther R.A. // *Embo J* – 1989. – V. 8. – P. 393–399.
139. Goedert, M. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease / Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A. // *Neuron* – 1989. – V. 3. – P. 519–526.
140. Golde, T.E. Expression of amyloid protein precursor mRNAs: Recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR / T.E. Golde, S. Estus, M. Usiak, L.H. Younkin S.G., Younkin S.G. // *Neuron* – 1990. – V. 4. – N. 2. – P. 253-267.
141. Golde, T.E.  $\gamma$ -Secretase inhibitors and modulators / T.E. Golde, E.H. Koo, K.M. Felsenstein, B.A. Osborne, L. Miele // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2013. – V. 1828. – N. 12. – P. 2898-2907
142. Gong, C.-X. Phosphorylation of Microtubule-associated Protein Tau Is Regulated by Protein Phosphatase 2A in Mammalian Brain. Implications for neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease / C.-X. Gong, T. Lidsky, J. Wegiel, L. Zuck, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal // *Journal of Biological Chemistry* – 2000. – V. 122. – P. 1709-1719.
143. Goto, J-I, Two novel 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) analogs differentially activate and inhibit store-operated Ca(2+) entry via STIM proteins / J-I. Goto, A.Z. Suzuki, S.N. Ozaki, N. Matsumoto, T. Nakamura, E. Ebisui, A. Fleig, R. Penner, K. Mikoshiba // *Cell Calcium*. – 2010. – V. 47. – N. 1. – P. 1–10.
144. Green, K.N. SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid beta production / Green K.N., Demuro A.,

- Akbari Y., Hitt B.D., Smith I.F., Parker I., LaFerla F.M. // *Journal of Cell Biology* – 2008. – V. 181. – P. 1107–1116.
145. Green, K.N. Linking calcium to A $\beta$  and Alzheimer's disease / K.N. Green, F.M. LaFerla // *Neuron*. – 2008. – V. 59. – P. 190–194.
146. Greeve, I. Age-Dependent Neurodegeneration and Alzheimer-Amyloid Plaque Formation in Transgenic *Drosophila* / I. Greeve // *Journal of Neuroscience* – 2004. – V. 24. – P. 3899–3906.
147. Griciuc, A. Alzheimer's disease risk gene cd33 inhibits microglial uptake of amyloid beta / Griciuc A., Serrano-Pozo A., Parrado A.R., Lesinski A.N., Asselin C.N., Mullin K., Hooli B., Choi S.H., Hyman B.T., Tanzi R.E. // *Neuron* – 2013. – V. 78. – P. 631–643.
148. Gruszczynska-Biegala, J. Differential roles for STIM1 and STIM2 in store-operated calcium entry in rat neurons / Gruszczynska-Biegala J., Pomorski P., Wisniewska M.B., Kuznicki J. // *PLoS ONE* – 2011. – V. 6. – e19285
149. Gudlur, A. STIM1 triggers a gating rearrangement at the extracellular mouth of the ORAI1 channel / Gudlur A., Quintana A., Zhou Y., Hirve N., Mahapatra S., Hogan P.G. // *Nature Communications* – 2014. – V. 5. – P. 5164.
150. Guerreiro, R. TREM2 variants in Alzheimer's disease / R. Guerreiro, A. Wojtas, J. Bras, M. Carrasquillo, E. Rogaeva, E. Majounie, C. Cruchaga, C. Sassi, J.S. Kauwe, S. Younkin, L. Hazrati, J. Collinge, J. Pocock, T. Lashley, J. Williams, J.C. Lambert, P. Amouyel, A. Goate, R. Rademakers, K. Morgan, J. Powell, P. St George-Hyslop, A. Singleton, J. Hardy // *N Engl J Med*, 368 (2013), pp. 117–127
151. Guerreiro, R, J Hardy. Genetics of Alzheimer's Disease / R. Guerreiro, J. Hardy // *Neurotherapeutics*. – 2014. – V. 11. – P. 732–737.
152. Gura, T. Hope in Alzheimer's fight emerges from unexpected places / T. Gura // *Nat Med*. – 2008. – V. 14. – N. 9. – P. 894.

153. Gusev, K. The store-operated calcium entry pathways in human carcinoma A431 cells: functional properties and activation mechanisms. / Gusev K., Glouchankova L., Zubov A., Kaznacheyeva E., Wang Z., Bezprozvanny I., Mozhayeva G.N. // *The Journal of general physiology* – 2003. – V. 122. – N. 1. – P. 81-94.
154. Haas, L.T. Metabotropic glutamate receptor 5 couples cellular prion protein to intracellular signalling in Alzheimer's disease / Haas L.T., Salazar S. V, Kostylev M.A., Um J.W., Kaufman A.C., Strittmatter S.M. // *Brain* – 2016. – V. 139. – P. 526–546.
155. Haidet-Phillips, A.M. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons / Haidet-Phillips A.M., Hester M.E., Miranda C.J., Meyer K., Braun L., Frakes A., Song S., Likhite S., Murtha M.J., Foust K.D., Rao M., Eagle A., Kammesheidt A., Christensen A., Mendell J.R., Burghes A.H.M., Kaspar B.K. // *Nature Biotechnology* – 2011. – V. 29. – P. 824–828.
156. Hall, J.C. The mating of a fly / J.C. Hall // *Science*. – 1994. – V. 264. – P. 1702–1714.
157. Hamer, M. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence / M. Hamer, Y. Chida // *Psychol.Med.* – 2008. – V. 39. – P. 3–11.
158. Hanger, D.P. New phosphorylation sites identified in hyperphosphorylated tau (paired helical filament-tau) from Alzheimer's disease brain using nanoelectrospray mass spectrometry / D.P. Hanger, J.C. Betts, T.L. Loviny, W.P. Blackstock, B.H. Anderton // *J Neurochem* – 1998. – V. 71. – P. 2465–2476.
159. Harney, S.C., Rowan M., Anwyl R. Long-term depression of NMDA receptor-mediated synaptic transmission is dependent on activation of metabotropic glutamate receptors and is altered to long-term potentiation by low intracellular calcium buffering // *J Neurosci*. 2006. V. 26. № 4. P. 1128-1132.

160. Harold, D. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease / D. Harold, R. Abraham, P. Hollingworth, J. Williams // *Nature Genetics* – 2013. – V. 41. – P. 1088–1093.
161. Harr, M.W. Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death. / M.W. Harr // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – V. 2. – N. 10. – a005579.
162. Hazrati, LN, Van Cauwenberghe C, Brooks PL, et al. Genetic association of CR1 with Alzheimer's disease: a tentative disease mechanism. *Neurobiol Aging* 2012;33:2949.e5–2949.e12.
163. He, L.P. A functional link between store-operated and TRPC channels revealed by the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole derivative, BTP2 / L.P. He, T. Hewavitharana, J. Soboloff, M.A. Spassova, D.L. Gill // *Journal of Biological Chemistry* – 2005. – V. 280. – N. 12. – P. 10997–11006.
164. Heilig, E.A. A presenilin-1 mutation identified in familial Alzheimer disease with cotton wool plaques causes a nearly complete loss of ??-secretase activity / Heilig E.A., Xia W., Shen J., Kelleher R.J. // *Journal of Biological Chemistry* – 2010. – V. 285. – N. 29. – P. 22350-22359.
165. Hendron, E. Potent functional uncoupling between STIM1 and Orai1 by dimeric 2-aminodiphenyl borinate analogs / Hendron E., Wang X., Zhou Y., Cai X., Goto J.I., Mikoshiba K., Baba Y., Kurosaki T., Wang Y., Gill D.L. // *Cell Calcium* – 2014. – V. 56. – N. 6. – P. 482-492.
166. Heneka, M.T. Inflammatory processes in Alzheimer's disease / M.T. Heneka, M.K. O'Banion // *J.Neuroimmunol.* – 2007. – V. 184. – P. 69–91.
167. Henke, N. The plasma membrane channel ORAI1 mediates detrimental calcium influx caused by endogenous oxidative stress / Henke N., Albrecht P., Bouchachia I., Ryazantseva M., Knoll K., Lewerenz J., Kaznacheyeva E., Maher P., Methner A. // *Cell Death and Disease* – 2013. – e470.
168. Herms, J. Capacitive calcium entry is directly attenuated by mutant presenilin-1, independent of the expression of the amyloid precursor protein /

- Herms J., Schneider I., Dewachter I., Caluwaerts N., Kretschmar H., Leuven F. Van // *Journal of Biological Chemistry* – 2003. – V. 278. – N. 4. – P. 2484-2489.
169. Herrup, K. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? / K. Herrup, Y. Yang // *Nature Reviews Neuroscience* – 2007. – V. 8. – P. 368–378.
170. Herrup, K. The role of ATM and DNA damage in neurons: Upstream and downstream connections / K. Herrup, J. Li, J. Chen // *DNA Repair* – 2013. – V. 12. – P. 600–604.
171. Hiltunen, M. Identification of a novel 4.6-kb genomic deletion in presenilin-1 gene which results in exclusion of exon 9 in a Finnish early onset Alzheimer's disease family: an Alu core sequence-stimulated recombination? / S. Helisalmi, A. Mannermaa, I. Alafuzoff, A.M. Koivisto, M. Lehtovirta, M. Pirskanen, R. Sulkava, A. Verkkoniemi, H. Soininen // *Eur J Hum Genet.* – 2000. – V. 8. – P. 259–266.
172. Hollingworth, P. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease / Hollingworth P., Harold D., Sims R., Williams J. // *Nature Genetics* – 2011. – V. 43. – P. 429–435.
173. Holm, I.E. Genetically modified pig models for neurodegenerative disorders / A.K. Alstrup, Y. Luo // *J. Pathol.* – 2016. – V. 238. – N. 2. – P. 267-287.
174. Holmes, O. Pen-2 is essential for  $\gamma$ -secretase complex stability and trafficking but partially dispensable for endoproteolysis / Holmes O., Paturi S., Selkoe D.J., Wolfe M.S. // *Biochemistry* – 2014. – V. 53. – N. 27. – P. 4393-4406.
175. Holmes, C. Long-term effects of A $\beta$ 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial / C. Holmes, D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R.

- Jones, R. Bullock, S. Love, J. Neal // *The Lancet* – 2008. – V. 372. P. 216–223.
176. Holowka, D. polyunsaturated fatty acids inhibit stimulated coupling between the ER Ca(2+) sensor STIM1 and the Ca(2+) channel protein Orai1 in a process that correlates with inhibition of stimulated STIM1 oligomerization / D. Holowka, M.K. Korzeniowski, K.L. Bryant, B. Baird // *Biochim. Biophys. Acta* – 2014. – V. 1841. – N. 8. – P. 1210–1216.
177. Honarnejad, K. Involvement of presenilin holoprotein upregulation in calcium dyshomeostasis of Alzheimer's disease / K. Honarnejad, C. K. E. Jung, S. Lammich, T. Arzberger, H. Kretzschmar, and J. Herms // *Journal of Cellular and Molecular Medicine* – 2013. – V. 17. – P. 293-302
178. Hoth, M. Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes / M. Hoth, D.C. Button, R.S. Lewis // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97. – N. 19. – P. 10607–10612.
179. Hoth, M. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells / M. Hoth, R. Penner // *J. Physiol.* – 1993. – V. 465. – P. 359–386.
180. Hoth, M. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. / M. Hoth, R. Penner // *Nature.* – 1992. – V. 355. – P. 353–356
181. Hsiao, K. Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. / P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yang, G. Cole // *Science.* 1996. – V. 274. – P. 99–102.
182. Hu, W. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) reverses beta amyloid-induced LTP deficit through blocking BAX and caspase-3 hyperactivation / W. Hu, Z. He, L. Yang, M. Zhang, D. Xing, and Z. Xiao // *Br J Pharmacol* – 2014. – V. 172. – P. 2273-2285.
183. MacDonald M.E. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. / M.E. MacDonald,

- C.M. Ambrose, M.P. Duyao, R.I. Richards // *Cell* – 1993. – V. 72. - P. 971–983.
184. Hussain M.M. Phase II trial of carboxyamidotriazole in patients with relapsed epithelial ovarian cancer / M. M. Hussain, H. Kotz, L. Minasian, A. Premkumar, G. Sarosy, E. Reed, S. Zhai, S. M. Steinberg, M. Raggio, V. K. Oliver, W. D. Figg, and E. C. Kohn // *J Clin.Oncol.* – 2003. – V. 21. – N. 23. – P. 4356–4363.
185. Hwang D. Calcium-Channel Blockers and Dementia Risk in Older Adults – National Health Insurance Service – Senior Cohort (2002–2013) – / D. Hwang, S. Kim, H. Choi, I.-H. Oh, B. S. Kim, H. R. Choi, S. Y. Kim, C. W. Won // *Circulation Journal* – 2016. – V. 80. – N. 11. – P. 2336-2342.
186. Iijima-Ando K, Transgenic drosophila models of Alzheimer’s disease and tauopathies / K. Iijima, K. Iijima-Ando // *Brain Struct. Funct.* – 2010. – V. 214. – P. 245-262.
187. Ilieva H. Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond / H. Ilieva // *J. Cell Biol.* – 2009. – V. 187. – P. 761–772.
188. Imbimbo, B.P. Gamma-Secretase Inhibitors and Modulators for the Treatment of Alzheimer’s Disease: Disappointments and Hopes / B.P. Imbimbo, G.A.M. Giardina. // *Current Topics in Medicinal Chemistry* – 2011. – V. 11. – N. 12. – P. 1555-1570.
189. Iourov, I.Y. Aneuploidy in the normal, Alzheimer’s disease and ataxia-telangiectasia brain: Differential expression and pathological meaning / I. Y. Iourov, S. G. Vorsanova, T. Liehr, and Y. B. Yurov // *Neurobiology of Disease* – 2009. - V. 34. – P. 212–220.
190. Iqbal, K. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies / K. Iqbal // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* – 2005. - V. 1739. – P. 198-210.
191. Ishiguro, K. Tau protein kinase I converts normal tau protein into A68-like component of paired helical filaments / K. Ishiguro, M. Takamatsu, K.

- Tomizawa, A. Omori, M. Takahashi, M. Arioka, T. Uchida, and K. Imahori // *Journal of Biological Chemistry* – 1992. – V. 267. – P. 10897–10901.
192. Ishikawa, J. A Pyrazole Derivative, YM-58483, Potently Inhibits Store-Operated Sustained Ca<sup>2+</sup> Influx and IL-2 Production in T Lymphocytes / J. Ishikawa, K. Ohga, T. Yoshino, R. Takezawa, A. Ichikawa, H. Kubota, and T. Yamada // *The Journal of Immunology* – 2003. – V. 170. – N. 9. – P. 4441–4449.
193. Ito, E. Internal Ca<sup>2+</sup> mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease / E. Ito, K. Oka, R. Etcheberrigaray, T. J. Nelson, D. L. McPhie, B. Tofel-Grehl, G. E. Gibson, D. L. Alkon. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1994. – V. 91. – P. 534-538.
194. Ittner, L.M. Amyloid- $\beta$  and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease / L. M. Ittner, J. Götz. // *Nature Reviews Neuroscience* – 2011. – V. 12. – N. 2. – P. 65-72.
195. Ittner, L.M. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. / L. M. Ittner, Y. D. Ke, F. Delerue, M. Bi, A. Gladbach, J. van Eersel, H. Wölfing, B. C. Chieng, M. J. Christie, I. a Napier, A. Eckert, M. Staufenbiel, E. Hardeman, J. Götz // *Cell* – 2010. – V. 142. – N. 3. – P. 387-97.
196. Izzo, N.J. Alzheimer's therapeutics targeting amyloid beta 1-42 oligomers II: Sigma-2/PGRMC1 receptors mediate Abeta 42 oligomer binding and synaptotoxicity / N. J. Izzo, J. Xu, C. Zeng, M. J. Kirk, K. Mozzoni, C. Silky, C. Rehak, R. Yurko, G. Look, G. Rishton, H. Safferstein, C. Cruchaga, A. Goate, M. A. Cahill, O. Arancio, R. H. Mach, R. Craven, E. Head, H. LeVine 3rd, T. L. Spires-Jones, S. M. Catalano // *PLoS One* – 2014. – V. 9. – N. 11. – e111899
197. Janssen, J.C. Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families / J. C. Janssen, J. A. Beck, T. A. Campbell, A. Dickinson, N. C. Fox, R. J. Harvey, H. Houlden, M. N. Rossor, J. Collinge // *Neurology* – 2003. – V. 60. – N. 2. – P. 235–239.

198. Jaunmuktane, Z. Evidence for human transmission of amyloid-beta pathology and cerebral amyloid angiopathy / Z. Jaunmuktane, S. Mead, M. Ellis, J. D. Wadsworth, A. J. Nicoll, J. Kenny, F. Launchbury, J. Linehan, A. Richard-Loendt, A. S. Walker, P. Rudge, J. Collinge, S. Brandner. // *Nature* – 2015. – V. 525. – P. 247–250.
199. Javitch, J. a Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. / J. a Javitch, R. J. D'Amato, S. M. Strittmatter, S. H. Snyder. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 1985. – V. 82. – N. 7. – P. 2173–2177.
200. Jaworska, A. Analysis of calcium homeostasis in fresh lymphocytes from patients with sporadic Alzheimer's disease or mild cognitive impairment / A. Jaworska, J. Dzbek, M. Styczynska, J. Kuznicki // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* – 2013. – V. 1833 – N. 7. – P. 1692–1699.
201. Jin, H. Presenilin-1 holoprotein is an interacting partner of sarco endoplasmic reticulum calcium-atpase and confers resistance to endoplasmic reticulum stress / H. Jin, N. Sanjo, T. Uchihara, K. Watabe, P.S. George-Hyslop, P.E. Fraser, H. Mizusawa // *Journal of Alzheimer's Disease* – 2010. – V. 20. – P. 261–273.
202. Jin, M. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration / N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh, D.J. Selkoe // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* -2001. V. 108. – P. 5819–5824.
203. Jonsson, T. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline / T. Jonsson, J. K. Atwal, S. Steinberg, J. Snaedal, P. V. Jonsson, S. Bjornsson, H. Stefansson, P. Sulem, D. Gudbjartsson, J. Maloney, K. Hoyte, A. Gustafson, Y. Liu, Y. Lu, T. Bhangale, R. R. Graham, J. Huttenlocher, G. Bjornsdottir, O. A. Andreassen,

- E. G. Jönsson, A. Palotie, T. W. Behrens, O. T. Magnusson, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, R. J. Watts, K. Stefansson // *Nature* – 2012. – V. 488. – P. 96–99.
204. Kamyshev, N.G. *Drosophila* conditioned courtship: two ways of testing memory. / N.G Kamyshev., K.G. Iliadi, J. V. Bragina // *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.) – 1999. – V. 6. – P. 1–20.
205. Kann, O. Muscarinic receptor activation determines the effects of store-operated Ca(2+)-entry on excitability and energy metabolism in pyramidal neurons / N. Taubenberger, C. Huchzermeyer, I.E. Papageorgiou, F. Benninger, U. Heinemann, R. Kovács // *Cell Calcium*. – 2012. – V. 51. – P. 40-50.
206. Karch, C.M. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis / C.M. Karch, A.M. Goate // *Biol Psychiatry*. – 2005. – V. 77. – P. 43–51
207. Karch, C.M. Expression of Novel Alzheimer's Disease Risk Genes in Control and Alzheimer's Disease Brains / C. M. Karch, A. T. Jeng, P. Nowotny, J. Cady, C. Cruchaga, A. M. Goate, // *PLoS ONE* – 2012. – V. 7. – e50976.
208. Karran, E. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? / E. Karran, B. De Strooper // *Journal of Neurochemistry* – 2016. – V. 139. – P. 237-252.
209. Kawamata, H. Abnormal Intracellular Calcium Signaling and SNARE-Dependent Exocytosis Contributes to SOD1G93A Astrocyte-Mediated Toxicity in Amyotrophic Lateral Sclerosis / Kawamata H., Ng S.K., Diaz N., Burstein S., Morel L., Osgood A., Sider B., Higashimori H., Haydon P.G., Manfredi G., Yang Y. // *Journal of Neuroscience* – 2014. – V. 34. – N. 6. – P. 2331-2348.
210. Kaye, R. Common Structure of Soluble Amyloid Oligomers Implies Common Mechanism of Pathogenesis / Kaye R. // *Science* – 2003. – V. 300. – P. 486–489.

211. Kaznacheyeva, E. Suppression of TRPC3 leads to disappearance of store-operated channels and formation of a new type of store-independent channels in A431 cells / E. Kaznacheyeva, L. Glushankova, V. Bugaj, O. Zimina, A. Skopin, V. Alexeenko, L. Tsiokas, I. Bezprozvanny, G.N. Mozhayeva // *J Biol Chem.* – 2007. – V. 282. – N. 32. – P. 23655-23662
212. Kaznacheyeva, E. Activation of calcium entry in human carcinoma A431 cells by store depletion and phospholipase C- dependent mechanisms converge on ICRCAC-like calcium channels. / E. Kaznacheyeva, A. Zubov, K. Gusev, I. Bezprozvanny, G. N. Mozhayeva // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2001. – V. 98. – N. 1. – P. 148-153.
213. Kaznacheyeva, E. Plasma membrane calcium channels in human carcinoma A431 cells are functionally coupled to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate complexes. / E. Kaznacheyeva, A. Zubov, A. Nikolaev, V. Alexeenko, I. Bezprozvanny, G. N. Mozhayeva // *The Journal of biological chemistry* – 2000. – V. 275. – N. 7. – P. 4561-4564.
214. Khachaturian, Z.S. Calcium, membranes, aging, and Alzheimer's disease. Introduction and overview / Z.S. Khachaturian // *Ann N Y Acad Sci.* – 1989. – V. 568. – P. 1–4.
215. Khachaturian, Z.S. Hypothesis on the regulation of cytosol calcium concentration and the aging brain. / Z.S. Khachaturian // *Neurobiol. Aging.* – 1987. – V. 8. – P. 345–346.
216. Khan, U.A. Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease / U. A. Khan, L. Liu, F. A. Provenzano, D. E. Berman, C. P. Profaci, R. Sloan, R. Mayeux, K. E. Duff, and S. A. Small // *Nature Neuroscience* – 2013. – V. 17. – P. 304–311.
217. Kim, J. Abeta40 inhibits amyloid deposition in vivo. / J. Kim, L. Onstead, S. Randle, R. Price, L. Smithson, C. Zwizinski, D. W. Dickson, T.

- Golde, E. McGowan. // *The Journal of Neuroscience* – 2007 - V. 27. – P. 627–633
218. Sun, D.K. Sequence analyses of presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease/ D. K. Sun, J. Kim // *Cell Stress Chaperones*. – 2008. – V. 13. – N. 4. – P. 401-412.
219. Kim, T. Human LirB2 is a beta-amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model / G.S. Vidal, M. Djurasic, C.M. William, M.E. Birnbaum, K.C. Garcia, B.T. Hyman, C.J. Shatz // *Science*. – V. 341. – N. 6152. – P. 1399–1404.
220. Kim, J. Normal cognition in transgenic BRI2-A $\beta$  mice. / J. Kim, P. Chakrabarty, A. Hanna, A. March, D. W. Dickson, D. R. Borchelt, T. Golde, C. Janus // *Molecular neurodegeneration* – 2013. – V. 8. – P. 15.
221. Kim, S.H. Evidence that the “NF” motif in transmembrane domain 4 of presenilin 1 is critical for binding with PEN-2 / S. H. Kim, S. S. Sisodia // *Journal of Biological Chemistry* – 2005. – V. 280. – P. 41953 – 41966
222. Kitahama, K. Distribution of Type-B Monoamine-Oxidase Immunoreactivity in the Cat Brain With Reference to Enzyme-Histochemistry / K. Kitahama, R. M. Denney, T. Maeda, M. Jouvet. // *Neuroscience* – 1991. – V. 44. – N. 1. – P. 185–204.
223. Klunk, W.E. Amyloid imaging with PET in Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and clinically unimpaired subjects / W. E. Klunk, C. A. Mathis, J. C. Price, S. T. DeKosky, B. J. Lopresti, N. D. Tsopelas, J. A. Saxton, R. D. Nebes // *Amyloid Imaging with PET in Alzheimer's Disease*. – 2009. – P. 119–147.
224. Kohn, E.C. A phase I trial of carboxyamido-triazole and paclitaxel for relapsed solid tumors: Potential efficacy of the combination and demonstration of pharmacokinetic interaction / E. C. Kohn, E. Reed, G. A. Sarosy, L. Minasian, K. S. Bauer, F. Bostick-Bruton, V. Kulpa, E. Fuse, A. Tompkins, M. Noone, B. Goldspiel, J. Pluda, W. D. Figg, L. A. Liotta // *Clinical Cancer Research* – 2001. – V. 7. – N. 6. – P. 1600–1609.

225. Kress, B.T. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain / B. T. Kress, J. J. Iliff, M. Xia, M. Wang, H. S. Wei Bs, D. Zeppenfeld, L. Xie, B. S. Hongyi Kang, Q. Xu, J. A. Liew, B. A. Plog, F. Ding, R.D. Phd, M. Nedergaard // *Annals of Neurology* – 2014. – V. 76. – P. 845–861.
226. Krstic D. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease / Krstic D., Knuesel I. // *Nature Reviews Neurology* – 2012. – V. 9. – P. 25–34.
227. Kruman I.I. Cell Cycle Activation Linked to Neuronal Cell Death Initiated by DNA Damage / Kruman I.I., Wersto R.P., Cardozo-Pelaez F., Smilenov L., Chan S.L., Chrest F.J., Emokpae R., Gorospe M., Mattson M.P. // *Neuron* – 2004. – V. 41. – P. 549–561.
228. Kuchibhotla K. V. Abeta Plaques Lead to Aberrant Regulation of Calcium Homeostasis In Vivo Resulting in Structural and Functional Disruption of Neuronal Networks / Kuchibhotla K. V., Goldman S.T., Lattarulo C.R., Wu H.Y., Hyman B.T., Bacskai B.J. // *Neuron* – 2008. – V. 59. – P. 214 – 225.
229. Kuperstein I. Neurotoxicity of Alzheimer's disease Ab peptides is induced by small changes in the Ab(42) to Ab(40) ratio / Kuperstein I., Broersen K., Benilova I., Rozenski J., Jonckheere W., Debulpaep M., Vandersteen A., Segers-Nolten I., Werf K. Van Der, Subramaniam V., Braeken D., Callewaert G., Bartic C., D'Hooge R., Martins I.C., Rousseau F., Schymkowitz J., Strooper B. De // *The EMBO Journal* – 2010. – V. 29. – P. 3408–3420.
230. Kurbatskaya K. Upregulation of calpain activity precedes tau phosphorylation and loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease brain / Kurbatskaya K., Phillips E.C., Croft C.L., Dentoni G., Hughes M.M., Wade M.A., Al-Sarraj S., Troakes C., O'Neill M.J., Perez-Nievas B.G., Hanger D.P., Noble W. // *Acta Neuropathologica Communications* – 2016. – V. 4. – P. 34.

231. Demuro A. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 3. – P. 862–872.
232. LaFerla F.M. Animal models of Alzheimer disease / LaFerla F.M., Green K.N. // *Cold Spring Harb Perspect Med* – 2012. – V. 2. – N. 11.
233. Lambert J.-C. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer’s disease / Lambert J.-C., Ibrahim-Verbaas C.A., Harold D., Amouyel P. // *Nature Genetics* – 2013. – V. 45. – P. 1452–1458.
234. Lau P. Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer’s disease / Lau P., Bossers K., Janky R., Salta E., Frigerio C.S., Barbash S., Rothman R., Sierksma A.S.R., Thathiah A., Greenberg D., Papadopoulou A.S., Achsel T., Ayoubi T., Soreq H., Verhaagen J., Swaab D.F., Aerts S., Strooper B. De // *EMBO Molecular Medicine* – 2013. – V. 5. – P. 1613–1634
235. Laurén J. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. / Laurén J., Gimbel D. a, Nygaard H.B., Gilbert J.W., Strittmatter S.M. // *Nature* – 2009. – V. 457. – P. 1128–1132.
236. Assembly of the {gamma}-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. / LaVoie M.J., Fraering P.C., Ostaszewski B.L., Ye W., Kimberly W.T., Wolfe M.S., Selkoe D.J. // *Journal of Biological Chemistry* – 2003. – V. 278. – P. 37213 – 37222.
237. Lawrence A.D. The cognitive psychopharmacology of Alzheimer’s disease: Focus on cholinergic systems / Lawrence A.D., Sahakian B.J. // *Neurochemical Research* – 1998. – V. 23. – N. 5. – P. 787-794.
238. Laws S.M. Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer’s disease: Possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription // *J. Neurochem.* – 2003. – V. 84. – N. 6. – P. 1215-1236.
239. Ledesma M.D. Implication of brain cdc2 and MAP2 kinases in the phosphorylation of tau protein in Alzheimer’s disease / Ledesma M.D.,

- Correas I., Avila J., Diaz-Nido J. // FEBS Letters – 1992. – V. 308. – P. 218–224.
240. Lee Y. Systematic review of health behavioral risks and cognitive health in older adults / Lee Y., Back J.H., Kim J., Kim S.H., Na D.L., Cheong H.K., Hong C.H., Kim Y.G. // Int Psychogeriatr – 2010. – V. 22. – P. 174–187.
241. Lee G. Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease / Lee G., Thangavel R., Sharma V.M., Litersky J.M., Bhaskar K., Fang S.M., Do L.H., Andreadis A., Hoesen G. Van, Ksiezak-Reding H. // J.Neurosci. – 2004. – V. 24. – P. 2304–2312.
242. Leissring M.A. Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice / Leissring M.A., Akbari Y., Fanger C.M., Cahalan M.D., Mattson M.P., LaFerla F.M. // Journal of Cell Biology – 2000. – V. 149. – N. 4. – P. 793-798.
243. Li B. Knockdown of STIM1 inhibits 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress through attenuating calcium-dependent ER stress and mitochondrial dysfunction in undifferentiated PC12 cells / Li B., Xiao L., Wang Z.Y., Zheng P.S. // Free Radical Research – 2014. – V. 48. – N. 7. – P. 758-768.
244. Li C.-R. Two novel mutations of the nicastrin gene in Chinese patients with acne inversa. / Li C.-R., Jiang M.-J., Shen D.-B., Xu H.-X., Wang H.-S., Yao X., Zhang Y., Zhou W.-Q., Wang B. // The British journal of dermatology – 2011. – V. 165. – N. 2. – P. 415-418
245. Li X. Inhibition of store-operated calcium entry attenuates MPP +- induced oxidative stress via preservation of mitochondrial function in PC12 cells: Involvement of Homer1a / Li X., Chen W., Zhang L., Liu W.B., Fei Z. // PLoS ONE – 2013. – V. 8. – N. 12. – e83638
246. Lichtenthaler S.F. Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. / Lichtenthaler S.F., Haass C., Steiner H. // Journal of neurochemistry – 2011. – V. 117. – N. 5. – P. 779-796.

247. Lindwall G. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly / Lindwall G., Cole R.D. // *Journal of Biological Chemistry* – 1984. – V. 259. – P. 5301–5305.
248. Lis A. CRACM1, CRACM2, and CRACM3 Are Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels with Distinct Functional Properties / Lis A., Peinelt C., Beck A., Parvez S., Monteilh-Zoller M., Fleig A., Penner R. // *Current Biology* – 2007. – V. 17. – N. 9. – P. 794–800.
249. Liu X. Distinct Ca<sup>2+</sup>-permeable cation currents are activated by internal Ca<sup>2+</sup>-store depletion in RBL-2H3 cells and human salivary gland cells, HSG and HSY / Liu X., Groschner K., Ambudkar I.S. // *Journal of Membrane Biology* – 2004. – V. 200. – P. 93–104
250. Liu X. Attenuation of store-operated Ca<sup>2+</sup> current impairs salivary gland fluid secretion in TRPC1(-/-) mice. / Liu X., Cheng K.T., Bandyopadhyay B.C., Pani B., Dietrich A., Paria B.C., Swaim W.D., Beech D., Yildirim E., Singh B.B., Birnbaumer L., Ambudkar I.S. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2007. – V. 104. – N. 44. – P. 17542-17547.
251. Liu F. Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome / Liu F., Liang Z., Wegiel J., Hwang Y.-W., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Ramakrishna N., Gong C.-X. // *The FASEB Journal* – 2008. – V. 22. – P. 3224–3233.
252. Liu F. PKA modulates GSK-3 $\beta$ - and cdk5-catalyzed phosphorylation of tau in site- and kinase-specific manners / Liu F., Liang Z., Shi J., Yin D., El-Akkad E., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Gong C.X. // *FEBS Letters* – 2006. – V. 580. – P. 6269–6274.
253. Liu F. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation / Liu F., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Gong C.X. // *European Journal of Neuroscience* – 2005. – V. 22. – P. 1942–1950.

254. Liu L. Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo / Liu L., Drouet V., Wu J.W., Witter M.P., Small S.A., Clelland C., Duff K. // PLoS ONE – 2012. – V. 7. – e31302.
255. Lopez J.R. Increased intraneuronal resting  $[Ca^{2+}]$  in adult Alzheimer's disease mice / Lopez J.R., Lyckman A., Oddo S., LaFerla F.M., Querfurth H.W., Shtifman A. // Journal of Neurochemistry – 2008. – V. 105. – P. 262 – 271.
256. Lotharius J. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. / Lotharius J., Dugan L.L., O'Malley K.L. // The Journal of Neuroscience – 1999. – V. 19. – N. 4. – P.1284–1293.
257. Lovell M.A. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease / Lovell M.A., Markesbery W.R. // Nucleic Acid Research – 2007. – V. 35. – P. 7497–7504.
258. Lu T. REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease / Lu T., Aron L., Zullo J., Pan Y., Kim H., Chen Y., Yang T.-H., Kim H.-M., Drake D., Liu X.S., Bennett D.A., Colaiácovo M.P., Yankner B.A. // Nature – 2014. – V. 507. – P. 448–454.
259. Lu F.P. Diabetes and the risk of multi-system aging phenotypes: A systematic review and meta-analysis // PLoS One. – 2009. – V. 4. – e4144
260. Luik R.M. Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation / Luik R.M., Wang B., Prakriya M., Wu M.M., Lewis R.S. // Nature – 2008. – V. 454. – P. 538–542.
261. Luo J. Cross interactions between the Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptide and other amyloid proteins: a further aspect of the amyloid cascade hypothesis / Luo J., Wärmländer S.K.T.S., Gräslund A., Abrahams J.P. // Journal of Biological Chemistry – 2016. – V. 291. – N. 32. – P. 16485-16493.
262. Luo L. Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for *appl* gene / Luo L., Tully T., White K. // Neuron – 1992. – V. 9. – P. 595–605.

263. Ma T. Mitochondrial modulation of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in model cells of Alzheimer's disease / Ma T., Gong K., Yan Y., Song B., Zhang X., Gong Y. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2012. – V. 426. – N. 2. – P. 196-202
264. Mahley R.W. Apolipoprotein E Sets the Stage: Response to Injury Triggers Neuropathology // *Neuron*. – 2012. – V. 76. – P. 871–885
265. Majewski L. SOCE in neurons: Signaling or just refilling? / Majewski L., Kuznicki J. // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* – 2014. – V. 1853. – N. 9. – P. 1940–1952.
266. Malouf R. Folic acid with or without vitamin B12 for the prevention and treatment of healthy elderly and demented people // *Cochrane Database Syst. Rev. Rev.* – 2008. – V. 4. – CD004514
267. Mangialasche F. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development / Mangialasche F., Solomon A., Winblad B., Mecocci P., Kivipelto M. // *The Lancet Neurology* – 2016. – V. 9. – N. 7. – P. 702-716.
268. Marambaud P. A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1-cleavage of N-Cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations / Marambaud P., Wen P.H., Dutt A., Shioi J., Takashima A., Siman R., Robakis N.K. // *Cell* – 2003. – V. 114. – P. 635–645.
269. Marcade M. Etazolate, a neuroprotective drug linking GABA A receptor pharmacology to amyloid precursor protein processing / Marcade M., Bourdin J., Loiseau N., Peillon H., Rayer A., Drouin D., Schweighoffer F., Désiré L. // *Journal of Neurochemistry* – 2008. – V. 106. – N. 1. – P. 392-404.
270. Marchetto M.C. Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells / Marchetto M.C., Muotri A.R., Mu Y., Smith A.M., Cezar G.G., Gage F.H. // *Cell Stem Cell* – 2008. – V. 3. – P. 649–657.
271. Marras C. Invited article: Changing concepts in Parkinson disease: Moving beyond the Decade of the Brain // *Neurology*. – 2008. – V. 70. – N. 21. – P. 1996–2003.

272. Martinez, A. GSK-3 inhibitors: a ray of hope for the treatment of Alzheimer's disease? / Martinez, A., Perez D.I. // *J Alzheimers Dis.* – 2008. – V.15. – N. 2. – P. 181-191.
273. Masliah E.  $\beta$ -Amyloid peptides enhance a-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease / Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I., Sagara Y., Mallory M., Hashimoto M., Mucke L. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2001. – V. 98. – P. 12245–12250.
274. Mason, M.J. The role of intracellular  $Ca^{2+}$  in the regulation of the plasma membrane  $Ca^{2+}$  permeability of unstimulated rat lymphocytes / Mahaut-Smith M.P., Grinstein S. J. // *Biol. Chem.* -1991. – V. 266. – N. 17. – P. 10872–10879.
275. Mattson M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease // *Nature.* – 2004. – V. 430. – P. 631–639.
276. McBride S.M.J. Pharmacological and Genetic Reversal of Age-Dependent Cognitive Deficits Attributable to Decreased presenilin Function / McBride S.M.J., Choi C.H., Schoenfeld B.P., Bell A.J., Liebelt D.A., Ferreira D., Choi R.J., Hinchey P., Kollaros M., Terlizzi A.M., Ferrick N.J., Koenigsberg E., Rudominer R.L., Sumida A., Chiorean S., Siwicki K.K., Nguyen H.T., Fortini M.E., McDonald T. V., Jongens T.A. // *Journal of Neuroscience* – 2010. – V. 30. – P. 9510-9522
277. McBride S.M.J. Pharmacological rescue of synaptic plasticity, courtship behavior, and mushroom body defects in a *Drosophila* model of Fragile X syndrome / McBride S.M.J., Choi C.H., Wang Y., Liebelt D., Braunstein E., Ferreira D., Sehgal A., Siwicki K.K., Dockendorff T.C., Nguyen H.T., McDonald T. V., Jongens T.A. // *Neuron* – 2005. – V. 45. – P. 753–764.
278. McGeer P.L. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: A review of 17 epidemiologic

- studies / McGeer P.L., Schulzer M., McGeer E.G. // *Neurology* – 1996. – V. 47. – P. 425–432.
279. McGowan E. A $\beta$ 42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice / McGowan E., Pickford F., Kim J., Onstead L., Eriksen J., Yu C., Skipper L., Murphy M.P., Beard J., Das P., Jansen K., DeLucia M., Lin W.L., Dolios G., Wang R., Eckman C.B., Dickson D.W., Hutton M., Hardy J., Golde T. // *Neuron* – 2005 – V. 47. – P. 191–199.
280. McLean C.A. Soluble pool of A $\beta$  amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease / McLean C.A., Cherny R.A., Fraser F.W., Fuller S.J., Smith M.J., Beyreuther K., Bush A.I., Masters C.L. // *Annals of Neurology* – 1999. – V. 46. – P. 860–866.
281. McNally B. a Permeation, selectivity and gating in store-operated CRAC channels. / McNally B. a, Prakriya M. // *The Journal of physiology* – 2012. – V. 590. – P. 4179–4191.
282. McShea A. Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease / McShea A., Harris P.L., Webster K.R., Wahl A.F., Smith M.A. // *Am.J.Pathol.* – 1997. – V. 150. – P. 1933–1939.
283. Melnik B.C. Impaired Notch signalling: The unifying mechanism explaining the pathogenesis of hidradenitis suppurativa (acne inversa) // *Br. J. Dermatol.* – 2013. – V. 168. – N. 4. – P. 876-878
284. Michaelson DM. APOE  $\epsilon$ 4: the most prevalent yet understudied risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2014 Nov;10(6):861-8.
285. Mignen O. Carboxyamidotriazole-induced inhibition of mitochondrial calcium import blocks capacitative calcium entry and cell proliferation in HEK-293 cells. / Mignen O., Brink C., Enfissi A., Nadkarni A., Shuttleworth T.J., Giovannucci D.R., Capiod T. // *Journal of cell science* – 2005. – V. 118. – N. 23. – P. 5615–5623.
286. Mitchell C.B. STIM1 is necessary for store-operated calcium entry in turning growth cones / Mitchell C.B., Gasperini R.J., Small D.H., Foa L. // *Journal of Neurochemistry* – 2012. – V. 122. – P. 1155-1166.

287. Moccia F. Stim and Orai proteins in neuronal Ca(2+) signaling and excitability. / Moccia F., Zuccolo E., Soda T., Tanzi F., Guerra G., Mapelli L., Lodola F., D'Angelo E. // *Frontiers in cellular neuroscience* – 2015. – V. 9. – P.153.
288. Mollet, P. Toxicity and mutagenicity of dimethyl sulfoxide in two strains of *Drosophila melanogaster* / Mollet, P., Graf, U., Würigler, F.E. // *Arch Genet (Zur)*. – 1974. – V. 47. – P. 184-190.
289. Moloney A. Alzheimer's disease: insights from *Drosophila melanogaster* models. / Moloney A., Sattelle D.B., Lomas D. a, Crowther D.C. // *Trends in biochemical sciences* – 2009. – V. 35. – P. 228-235.
290. Morales R. Titration of biologically active amyloid- $\beta$  seeds in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease / Morales R., Bravo-Alegria J., Duran-Aniotz C., Soto C. // *Scientific Reports* – 2015. – 9349.
291. Morgan, D. Immunotherapy for Alzheimer's disease // *J Intern Med*. – 2010. – V. 269. – P. 54-63.
292. Mosher K.I. Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. / Mosher K.I., Tony W.-C. // *Biochem. Pharmacol.* – 2014. – V. 88. – P. 594–604.
293. Morales R. Titration of biologically active amyloid- $\beta$  seeds in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease / Morales R., Bravo-Alegria J., Duran-Aniotz C., Soto C. // *Scientific Reports* – 2015.
294. Mudher A. Alzheimer's disease - Do tauists and baptists finally shake hands? // *Trends Neurosci.* – 2002. – V. 25. – N. 1. – P. 22 – 26.
295. Muik M. A cytosolic homomerization and a modulatory domain within STIM1 C terminus determine coupling to ORAI1 channels / Muik M., Fahrner M., Derler I., Schindl R., Bergsmann J., Frischauf I., Groschner K., Romanin C. // *Journal of Biological Chemistry* – 2009. – V. 284. – P. 8421– 8426.
296. Müller M. Constitutive cAMP response element binding protein (CREB) activation by Alzheimer's disease presenilin-driven inositol trisphosphate receptor (InsP<sub>3</sub>R) Ca<sup>2+</sup> signaling. / Müller M., Cárdenas C.,

- Mei L., Cheung K.-H., Foskett J.K. // PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2011.
297. Musiek E.S. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and “wingmen” / Musiek E.S., Holtzman D.M. // Nature Neuroscience – 2015. – V. 18. – P. 800–806
298. Nagai M. Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons / Nagai M., Re D.B., Nagata T., Chalazonitis A., Jessell T.M., Wichterle H., Przedborski S. // Nature Neuroscience – 2007. – V. 10. – P. 615– 622.
299. Nagy Z. Cell cycle markers in the hippocampus in Alzheimer’s disease / Nagy Z., Esiri M.M., Cato A.M., Smith A.D. // Acta Neuropathologica – 1997. – V. 94. – P. 6–15.
300. Naj A.C. Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer’s disease / Naj A.C., Jun G., Beecham G.W., Wang L.-S., Vardarajan B.N., Buross J., Gallins P.J., Buxbaum J.D., Jarvik G.P., Crane P. k., Larson E.B. // Nat. Genet. – 2011. V. 43. – P. 436–441.
301. Nazir A. Evaluation of the No Observed Adverse Effect Level of Solvent Dimethyl Sulfoxide in *Drosophila melanogaster* / Nazir A., Mukhopadhyay I., Saxena D.K., Chowdhuri D.K. // Toxicology Mechanisms and Methods – 2003. – V. 13. – P. 147-152.
302. Nekrasov E.D. Manifestation of Huntington’s disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons / Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., Lebedeva O.S., Vassina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I. V., Semashko T.A., Kiseleva E., Suldina L.A., Bobrovsky P.A., Zimina O.A., Ryazantseva M.A., Skopin A.Y., Illarioshkin S.N., Kaznacheeva E. V., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // Molecular Neurodegeneration – 2016. – V. 11 – N. 1 – P. 27.
303. Siaw W.N. Sustained activation of the tyrosine kinase syk by antigen in mast cells requires local Ca<sup>2+</sup> influx through Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup>

- channels / Siaw W.N., Capite J. Di, Singaravelu K., Parekh A.B. // *Journal of Biological Chemistry* – 2008. – V. 283. – N. 46. – P. 31348–31355.
304. Nicoll A.J. Amyloid- $\beta$  nanotubes are associated with prion protein-dependent synaptotoxicity / Nicoll A.J., Panico S., Freir D.B., Wright D., Terry C., Risse E., Herron C.E., O'Malley T., Wadsworth J.D.F., Farrow M.A., Walsh D.M., Saibil H.R., Collinge J. // *Nature Communications* – 2013. – V. 4. – P. 2416–2423.
305. Niimura M. Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions / Niimura M., Isoo N., Takasugi N., Tsuruoka M., Ui-Tei K., Saigo K., Morohashi Y., Tomita T., Iwatsubo T. // *Journal of Biological Chemistry* – 2005. – V. 280. – P. 12967 – 12975.
306. Nixon R.A. Lysosomal system pathways : Genes to neurodegeneration in Alzheimer ' s disease / Nixon R.A., Cataldo A.M. // *J Alzheimers Dis* – 2006. – V. 9. – P. 277–289.
307. Noack R. Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential / Noack R., Frede S., Albrecht P., Henke N., Pfeiffer A., Knoll K., Dehmel T., Meyer zu Hörste G., Stettner M., Kieseier B.C., Summer H., Golz S., Kochanski A., Wiedau-pazos M., Arnold S., Lewerenz J., Methner A. // *Human Molecular Genetics* – 2012. – V. 21. – P. 150–162.
308. Oddo, S. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease / Oddo S., Caccamo A., Kitazawa M., Tseng B.P., LaFerla F.M. // *Neurobiol Aging*. – 2003. – V. 24. – P. 1063–1070.
309. Ohana L. The Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> current (I<sub>CRAC</sub>) mediates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in rat microglia / Ohana L., Newell E.W., Stanley E.F., Schlichter L.C. // *Channels* – 2009. – V. 3. – N. 2. – P. 129–139.

310. Ong H.L. Role of TRPC channels in store-operated calcium entry / Ong H.L., de Souza L.B., Ambudkar I.S. // *Adv Exp Med Biol.* – 2016. – V. 898. – P. 87-109.
311. Oules B. Ryanodine Receptor Blockade Reduces Amyloid- Load and Memory Impairments in Tg2576 Mouse Model of Alzheimer Disease / Oules B., Prete D. Del, Greco B., Zhang X., Lauritzen I., Sevalle J., Moreno S., Paterlini-Brechot P., Trebak M., Checler F., Benfenati F., Chami M. // *Journal of Neuroscience* – 2012. – V. 32. – N. 34. – P. 11820-11834.
312. Owen A.M. Putting brain training to the test / Owen A.M., Hampshire A., Grahn J.A., Stenton R., Dajani S., Burns A.S., Howard R.J., Ballard C.G. // *Nature* – 2010. – V. 465. – P. 775–778.
313. Owsianik G. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* – 2006. – V. 156. – P. 61–90.
314. Page, M. Generation of Ab38 and Ab42 Is Independently and Differentially Affected by Familial Alzheimer Disease-associated Presenilin Mutations and gamma-Secretase Modulation / K. Baumann, M. Tomioka, B. Perez-Revuelta, A. Fukumo, H. Jacobsen, A. Flohr, T. Luebbbers, L. Ozmen, G. Steiner, C. Haass // *The journal of biological chemistry* – 2008. – V. 283. – N. 2. – P. 677–683.
315. Palop J.J. Neuronal depletion of calcium-dependent proteins in the dentate gyrus is tightly linked to Alzheimer's disease-related cognitive deficits / Palop J.J., Jones B., Kekoni L., Chin J., Yu G.Q., Raber J., Masliah E., Mucke L. // *Proc Natl Acad Sci U S A* – 2003. – V. 100. – P. 9572 - 9577;
316. Papp K. V Immediate and delayed effects of cognitive interventions in healthy elderly: a review of current literature and future directions / Papp K. V, Walsh S.J., Snyder P.J. // *Alzheimers Dement* – 2009. – V. 5. – P. 50–60.
317. Parekh A.B. The store-operated calcium current I(CRAC): nonlinear activation by InsP3 and dissociation from calcium release / Parekh A.B., Fleig A., Penner R. // *Cell* – 1997. – V. 89. – P. 973–980.

318. Parekh A. Store-operated calcium channels. / Parekh A., Putney J.J. // *Physiol Rev* – 2005. – V. 85. – N. 2. – P. 757-810.
319. Park C.Y. STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orail / Park C.Y., Hoover P.J., Mullins F.M., Bachhawat P., Covington E.D., Raunser S., Walz T., Garcia K.C., Dolmetsch R.E., Lewis R.S. // *Cell* – 2009. – V. 136. – P. 876– 890.
320. Park I.H. Zinc enhances synthesis of presenilin 1 in mouse primary cortical culture / Park I.H., Jung M.W., Mori H., Mook-Jung I. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2001. – V. 285. – P. 680–688.
321. Payne A.J. Presenilins regulate the cellular activity of ryanodine receptors differentially through isotype-specific N-terminal cysteines / Payne A.J., Gerdes B.C., Naumchuk Y., McCalley A.E., Kaja S., Koulen P. // *Experimental Neurology* – 2013. – V. 250. – P. 143–150.
322. Pei J.J. Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration / Pei J.J., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Bogdanovic N., Winblad B., Cowburn R.F. // *Brain Research* – 1998. – V. 797. – P. 267–277.
323. Pei J.-J. Distribution of active glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) in brains staged for Alzheimer disease neurofibrillary changes. / Pei J.-J., Braak E., Braak H., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Winblad B., Cowburn R.F. // *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* – 1999. – V. 58. – P. 1010–1019.
324. Pei J.J. Localization of active forms of C-jun kinase (JNK) and p38 kinase in Alzheimer's disease brains at different stages of neurofibrillary degeneration / Pei J.J., Braak E., Braak H., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Winblad B., Cowburn R.F. // *Journal of Alzheimer's disease*. – 2001. – V. 3. – P. 41–48.
325. Periz G. Functional reconstitution of  $\gamma$ -secretase through coordinated expression of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2 // *J. Neurosci. Res.* – 2004. – V. 77. – P. 309–322

326. Potter H. Role of Trisomy 21 Mosaicism in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. / Potter H., Granic A., Caneus J. // Current Alzheimer research – 2016. – V. 13. – N. 1. – P. 7-17.
327. Pottier C. High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease / Pottier C., Hannequin D., Coutant S., Rovelet-Lecrux A., Wallon D., Rousseau S., Legallic S., Paquet C., Bombois S., Pariente J., Thomas-Anterion C., Michon A., Croisile B., Etcharry-Bouyx F., Berr C., Dartigues J.-F., Amouyel P., Dauchel H., Boutoleau-Bretonnière C., Thauvin C., Frebourg T., Lambert J.-C., Campion D. // Molecular Psychiatry – 2012. – V. 17. – P. 875–879.
328. Prakriya M. Potentiation and inhibition of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels by 2-aminoethyl-diphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP<sub>3</sub> receptors / Prakriya M., Lewis R.S. // The Journal of Physiology – 2001. – V. 536. – P. 3–19.
329. Prakriya M. Store-Operated Calcium Channels / Prakriya M., Lewis R.S. // Physiol. Rev. – 2015. – V. 95. – N. 4. – P. 1383-436.
330. Przedborski S. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease // J Bioenerg Biomembr. – 2004. – V. 36. – N. 4. – P. 375–379.
331. Putney J. Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. / Putney J. // The Journal of cell biology – 2005. – V. 169. – N. 3. – P. 381-382.
332. Qiang L. Tau Protects Microtubules in the Axon from Severing by Katanin / Qiang L. // Journal of Neuroscience – 2006. – V. 26. – P. 3120–3129.
333. Qiu C. The age-dependent relation of blood pressure to cognitive function and dementia // Lancet Neurol. – 2005. – V. 4. – P. 487–99.
334. Rademakers R. Tau (MAPT) Mutation Arg406Trp Presenting Clinically with Alzheimer Disease Does Not Share a Common Founder in Western Europe [1] // Hum. Mutat. – 2003. – V. 18. – N. 5. – P. 421-430.

335. Rahman M. Intraperitoneal injection of JNK-specific inhibitor SP600125 inhibits the expression of presenilin-1 and Notch signaling in mouse brain without induction of apoptosis / Rahman M., Zhang Z., Mody A.A., Su D.M., Das H.K. // *Brain Research* – 2012. – V. 1448. – P. 117–128.
336. Rapoport M. Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity / Rapoport M., Dawson H.N., Binder L.I., Vitek M.P., Ferreira A. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2002. – V. 99. – P. 6364–6369.
337. Ratovitski, T. Endoproteolytic processing and stabilization of wild-type and mutant presenilin / H.H. Slunt, G. Thinakaran, D.L. Price, S.S. Sisodia, D.R. Borchelt // *J Biol Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 24536–24541.
338. Raux G. Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update / Raux G., Guyant-Marechal L., Martin C., Bou J., Penet C., Brice A., Hannequin D., Frebourg T., Campion D. // *Journal of medical genetics* – 2005. – V. 42. – N. 10. – P. 793–795.
339. Ravaglia G. Plasma tocopherols and risk of cognitive impairment in an elderly Italian cohort / Ravaglia G., Forti P., Lucicesare A., Pisacane N., Rietti E., Mangialasche F., Cecchetti R., Patterson C., Mecocci P. // *American Journal of Clinical Nutrition* – 2008. – V. 87. – N. 5. – P. 1306-1313.
340. Ribeiro C.M.P. Role of the cytoskeleton in calcium signaling in NIH 3T3 cells. An intact cytoskeleton is required for agonist-induced  $[Ca^{2+}]_i$  signaling, but not for capacitative calcium entry / Ribeiro C.M.P., Reece J., Putney J.W. // *Journal of Biological Chemistry* – 1997. – V. 272. – N. 42. – P. 26555–2656.
341. Rice L. V. Characterization of selective Calcium-Release Activated Calcium channel blockers in mast cells and T-cells from human, rat, mouse and guinea-pig preparations / Rice L. V., Bax H.J., Russell L.J., Barrett V.J., Walton S.E., Deakin A.M., Thomson S.A., Lucas F., Solari R., House D., Begg M. // *European Journal of Pharmacology* – 2013. – V. 704. – P. 49–57.

342. Robberecht, W. The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis / Robberecht W, Philips T // *Nat Rev Neurosci.* – 2013. – V. 14. – P. 248–264.
343. Roberson E.D. Amyloid- /Fyn-Induced Synaptic, Network, and Cognitive Impairments Depend on Tau Levels in Multiple Mouse Models of Alzheimer's Disease / Roberson E.D., Halabisky B., Yoo J.W., Yao J., Chin J., Yan F., Wu T., Hamto P., Devidze N., Yu G.-Q., Palop J.J., Noebels J.L., Mucke L. // *Journal of Neuroscience* – 2011. – V. 31. – P. 700–711.
344. Rodland K.D. Thapsigargin-induced gene expression in nonexcitable cells is dependent on calcium influx / Rodland K.D., Wersto R.P., Hobson S., Kohn E.C. // *Molecular Endocrinology* – 1997. – V. 11. – N. 3. – P. 281–291.
345. Rogaeva E. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease / Rogaeva E., Meng Y., Lee J.H., Gu Y., Kawarai T., Zou F., Katayama T., Baldwin C.T., Cheng R., Hasegawa H., Chen F., Shibata N., Lunetta K.L., Pardossi-Piquard R., Bohm C., Wakutani Y., Adrienne Cupples L., Cuenco K.T., Green R.C., Pinessi L., Rainero I., Sorbi S., Bruni A., Duara R., Graff-Radford N., Petersen R.C., Dickson D., Der S.D., Fraser P.E., Schmitt-Ulms G., Younkin S., Mayeux R., Farrer L.A., St George-Hyslop P. // *Nature Genetics* – 2007. – V. 39. – P. 168–177.
346. Roher A.E. Familial Presenilin Mutations and Sporadic Alzheimer's Disease Pathology: Is the Assumption of Biochemical Equivalence Justified? / Roher A.E., Maarouf C.L., Kokjohn T.A. // *Journal of Alzheimer's Disease* – 2016. – V. 50. – N. 3. – P. 645-658
347. Rooke J. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis. / Rooke J., Pan D., Xu T., Rubin G.M. // *Science.* – 1996. – V. 273. – P. 1227–1231.
348. Roos J. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function / Roos J., DiGregorio P.J., Yeromin A. V., Ohlsen K., Lioudyno M., Zhang S., Safrina O., Kozak J.A., Wagner S.L., Cahalan M.D., Velichelebi G., Stauderman K.A. // *Journal of Cell Biology* – 2005. – V. 169. – P. 435-445.

349. Roses A.D. On the discovery of the genetic association of Apolipoprotein E genotypes and late-onset Alzheimer disease // *J. Alzheimers Dis.* – 2006. – V. 9. – N. 3. – P. 361–366.
350. Rybalchenko V. The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity / Rybalchenko V., Hwang S.Y., Rybalchenko N., Koulen P. // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* – 2008. – V. 40. – P. 84–97.
351. Sahin M. Induction of Bcl-2 by functional regulation of G-protein coupled receptors protects from oxidative glutamate toxicity by increasing glutathione / Sahin M., Saxena A., Joost P., Lewerenz J., Methner A. // *Free Radical Research* – 2006. – V. 40. – P. 1113–1123.
352. Saito T. Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A $\beta$ 43 / Saito T., Suemoto T., Brouwers N., Slegers K., Funamoto S., Mihira N., Matsuba Y., Yamada K., Nilsson P., Takano J., Nishimura M., Iwata N., Broeckhoven C. Van, Ihara Y., Saido T.C. // *Nature Neuroscience* – 2011. – V.14. – P. 1023–1032.
353. Salloway S. A phase 2 randomized trial of ELND005, scyllo-inositol, in mild to moderate Alzheimer disease / Salloway S., Sperling R., Keren R., Porsteinsson A.P., Dyck C.H. Van, Tariot P.N., Gilman S., Arnold D., Abushakra S., Hernandez C., Crans G., Liang E., Quinn G., Bairu M., Pastrak A., Cedarbaum J.M. // *Neurology* – 2011. – V. 77. – N. 13. = P. 1253-1262.
354. Salomone S1, Caraci F, Leggio GM, Fedotova J, Drago F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs. *Br J Clin Pharmacol*, 2011. 73(4): p. 504-17.
355. Salvaterra PM1, Kitamoto T. Drosophila cholinergic neurons and processes visualized with Gal4/UAS-GFP. *Brain Res Gene Expr Patterns*. 2001 Aug;1(1):73-82.
356. Sanders, D. W. et al. Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies. *Neuron* 82, 1271–1288 (2014).

357. Sato, T., Dohmae, N., Qi, Y., Kakuda, N., Misonou, H., Mitsumori, R., Maruyama, H., Koo, E.H., Haass, C., Takio, K., et al. (2003). Potential link between amyloid beta-protein 42 and C-terminal fragment gamma 49-99 of beta-amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 278, 24294 – 24301.
358. Sato, T., Tanimura, Y., Hirotsu, N., Saido, T.C., Morishima-Kawashima, M., and Ihara, Y. (2005). Blocking the cleavage at midportion between gamma- and epsilon-sites remarkably suppresses the generation of amyloid beta-protein. *FEBS Lett.* 579, 2907 – 2912.
359. Savva GM, Stephan BC. Alzheimer's Society Vascular Dementia Systematic Review Group. Epidemiological studies of the effect of stroke on incident dementia: a systematic review. *Stroke* 2010; 41: e41–46.
360. Scarmeas N, Stern Y, Tang MX, Mayeux R, Luchsinger JA. Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2006; 59: 912–21.
361. Scheltens, P. Alzheimer's disease / K. Blennow, M.M. Breteler, B. de Strooper, G.B. Frisoni, S. Salloway S, W.M. Van der Flier // *Lancet.* – 2016. – V. 10043. – N. 388. – P. 505-517.
362. Schindl R, Bergsmann J, Frischauf I et al. 2-aminoethoxydiphenyl borate alters selectivity of Orai3 channels by increasing their pore size. *J. Biol. Chem.* 283(29), 20261–20267 (2008).
363. Schleifer H. Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca(2+) entry pathways. / Schleifer H., Doleschal B., Lichtenegger M., Oppenrieder R., Derler I., Frischauf I., Glasnov T.N., Kappe C.O., Romanin C., Groschner K. // *British journal of pharmacology* – 2012. – V. 167. – P. 1712–1722.
364. Selvaraj S. Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves downregulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling / Selvaraj S., Sun Y., Watt J.A., Wang S., Lei S., Birnbaumer L., Singh B.B. // *Journal of Clinical Investigation* – 2012. – V. 122. – P. 1354-1367.

365. Selvaraj S. TRPC1 inhibits apoptotic cell degeneration induced by dopaminergic neurotoxin MPTP/MPP+ / Selvaraj S., Watt J.A., Singh B.B. // *Cell Calcium* – 2009. – V. 46. – P. 209-218.
366. Sengupta A. Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules / Sengupta A., Kabat J., Novak M., Wu Q., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. // *Arch Biochem Biophys* – 1998. – V. 357. – P. 299–309.
367. Sengupta A. Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5 / Sengupta A., Wu Q., Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Singh T.J. // *Molecular and Cellular Biochemistry* – 1997. – V. 167. – P. 99–105.
368. Sepulveda-Falla D. Familial Alzheimer's disease-associated presenilin-1 alters cerebellar activity and calcium homeostasis / Sepulveda-Falla D., Barrera-Ocampo A., Hagel C., Korwitz A., Vinueza-Veloz M.F., Zhou K., Schonewille M., Zhou H., Velazquez-Perez L., Rodriguez-Labrada R., Villegas A., Ferrer I., Lopera F., Langer T., Zeeuw C.I. De, Glatzel M. // *Journal of Clinical Investigation* – 2014. – V. 124. – P. 1552-1567.
369. Seshadri S. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. / Seshadri S., Fitzpatrick A.L., Ikram A.A., Consortium" "EADI1 // *JAMA* – 2010. – V. 303. – P. 1832–1840.
370. Shah S. Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. / Shah S., Lee S.-F., Tabuchi K., Hao Y.-H., Yu C., LaPlant Q., Ball H., Dann C.E., Südhof T., Yu G. // *Cell* – 2005. – V. 122. – P. 435 – 447.
371. Shalygin A. STIM1 and STIM2 proteins differently regulate endogenous store-operated channels in HEK293 cells / Shalygin A., Skopin A., Kalinina V., Zimina O., Glushankova L., Mozhayeva G.N., Kaznacheyeva E. // *Journal of Biological Chemistry* – 2015. – V. 290. – N. 8. – P. 4717–4727.
372. Shalygin, A., Role of ORAI Proteins in Activation of Endogenous TRPC1-Composed Channels / Shalygin A., Skopin, A., Kolesnikov D.,

- Glushankova, L, Kaznacheeva, E // *Biophysical Journal*. – 2017. – V. 112. – P. 484a.
373. Shen, J. Skeletal and CNS defects in presenilin-1-deficient mice / R. Bronson, D. Chen, W. Xia, D. Selkoe, S. Tonegawa // *Cell* – 1997. – V. 89. – N. 4. – P. 629–639.
374. Shideman C.R. gamma-Secretase activity modulates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry into rat sensory neurons. / Shideman C.R., Reinardy J.L., Thayer S.A. // *Neurosci Lett* – 2009. – V. 451. – P. 124-128.
375. Shilling D. Suppression of InsP3 Receptor-Mediated Ca<sup>2+</sup> Signaling Alleviates Mutant Presenilin-Linked Familial Alzheimer's Disease Pathogenesis / Shilling D., Muller M., Takano H., Daniel Mak D.-O., Abel T., Coulter D.A., Foskett J.K. // *Journal of Neuroscience* – 2014. – V. 34. - P. 6910-6923.
376. Shim S. A critical role for STIM1 in filopodial calcium entry and axon guidance. / Shim S., Zheng J.Q., Ming G.-L. // *Molecular brain* – 2013. – V. 6. – P. 51.
377. Siegel R.W. Conditioned responses in courtship behavior of normal and mutant *Drosophila* / Siegel R.W., Hall J.C. // *Proceedings of the National Academy of Science, USA* – 1979. – V. 76. – P. 3430 –3434.
378. Šimić G. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies // *Biomolecules*. – 2016. – V. 6. – P. 6.
379. Singh A. The transient receptor potential channel antagonist SKF96365 is a potent blocker of low-voltage-activated T-type calcium channels / Singh A., Hildebrand M.E., Garcia E., Snutch T.P. // *Br J Pharmacol* – 2010. – V. 160. – P. 1464–1475.
380. Singh T.J. Differential phosphorylation of human tau isoforms containing three repeats by several protein kinases. / Singh T.J., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. // *Archives of biochemistry and biophysics* – 1996. – V. 328. – P. 43–50.

381. Singh T.J. Rapid Alzheimer-like phosphorylation of tau by the synergistic actions of non-proline-dependent protein kinases and GSK-3 / Singh T.J., Haque N., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. // *FEBS Letters* – 1995. – V. 358. – P. 267–272.
382. Singh T.J. Non-proline-dependent protein kinases phosphorylate several sites found in tau from Alzheimer disease brain / Singh T.J., Zaidi T., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. // *Molecular and Cellular Biochemistry* – 1996. – V. 154. – P. 143–151.
383. Sironi J.J. Ser-262 in human recombinant tau protein is a markedly more favorable site for phosphorylation by CaMKII than PKA or PhK / Sironi J.J., Yen S.H., Gondal J.A., Wu Q., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. // *FEBS Letters* – 1998. – V. 436. – P. 471–475.
384. Skibinska-Kijek A. Immunolocalization of STIM1 in the mouse brain / Skibinska-Kijek A., Wisniewska M.B., Gruszczynska-Biegala J., Methner A., Kuznicki J. // *Acta Neurobiologiae Experimentalis* – 2009. – V. 69. – N. 4. – P. 413–428.
385. Smyth, J.T. Calcium store-dependent and independent reversal of stim1 localization and function / Smyth J.T., Dehaven W.I., Bird G.S., Putney J.W. // *J. Cell Sci.* – 2008. – V. 121. – P. 762–772.
386. Smyth J.T. Activation and regulation of store-operated calcium entry / Smyth J.T., Hwang S.Y., Tomita T., DeHaven W.I., Mercer J.C., Putney J.W. // *J Cell Mol Med* – 2010. – V. 14. – N. 10. – P. 2337-2349.
387. Soboloff J. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers / Soboloff J., Rothberg B.S., Madesh M., Gill D.L. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2012. – V. 13. – P. 549-565.
388. Sodero A.O. Cholesterol loss during glutamate-mediated excitotoxicity / Sodero A.O., Vriens J., Ghosh D., Stegner D., Brachet A., Pallotto M., Sassoè-Pognetto M., Brouwers J.F., Helms J.B., Nieswandt B., Voets T., Dotti C.G. // *The EMBO Journal* – 2012. – V. 31. – N. 7. – P. 1764-1773.

389. Somasundaram A. Store-Operated CRAC Channels Regulate Gene Expression and Proliferation in Neural Progenitor Cells / Somasundaram A., Shum A.K., McBride H.J., Kessler J.A., Feske S., Miller R.J., Prakriya M. // *Journal of Neuroscience* – 2014. – V. 34. – P. 9107-9123
390. Sperling R. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging- Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease / Sperling R., Aisen P., Beckett L. // *Alzheimers Dement.*– 2011. – V. 7. – P. 280–292.
391. Stathopulos P.B. Structural and Mechanistic Insights into STIM1-Mediated Initiation of Store-Operated Calcium Entry / Stathopulos P.B., Zheng L., Li G.Y., Plevin M.J., Ikura M. // *Cell* – 2008. – V. 135. – P. 110–122.
392. Steinbeck J.A. Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy / Steinbeck J.A., Henke N., Opatz J., Gruszczynska-Biegala J., Schneider L., Theiss S., Hamacher N., Steinfarz B., Goltz S., Kuznicki J., Methner A. // *Experimental Neurology* – 2011. – V. 232. – P. 185-194.
393. Steinberg S. Loss-of-function variants in ABCA7 confer risk of Alzheimer's disease / Steinberg S., Stefansson H., Jonsson T., Johannsdottir H., Ingason A., Helgason H., Sulem P., Magnusson O.T., Gudjonsson S.A., Unnsteinsdottir U., Kong A., Helisalmi S., Soininen H., Lah J.J., Almdahl I.S., Andersen F., Bogdanovic N., Brækhus A., Engedal K., Rongve A., Saltvedt I., Stordal E., Witoelar A., Aarsland D., Fladby T., Ulstein I.D., Djurovic S., Sando S.B., White L.R., Knudsen G.-P., Westlye L.T., Selbæk G., Giegling I., Hampel H., Hiltunen M., Levey A.I., Andreassen O.A., Rujescu D., Jonsson P. V, Bjornsson S., Snaedal J., Stefansson K. // *Nature Genetics* – 2015. – V. 47. – P. 445–447.
394. Storch U. Transient receptor potential channel 1 (TRPC1) reduces calcium permeability in heteromeric channel complexes / Storch U., Forst

- A.L., Philipp M., Gudermann T., Mederos Y Schnitzler M. // *Journal of Biological Chemistry* – 2012. – V. 287. – P. 3530-3540.
395. Strübing C. Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain / Strübing C., Krapivinsky G., Krapivinsky L., Clapham D.E. // *Journal of Biological Chemistry* – 2003. – V. 278. – P. 39014-39019.
396. Stürchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94: Sun S. Reduced synaptic STIM2 expression and impaired store-operated calcium entry cause destabilization of mature spines in mutant presenilin mice / Sun S., Zhang H., Liu J., Popugaeva E., Xu N.J., Feske S., White C.L., Bezprozvanny I. // *Neuron* – 2014. – V. 82. – P. 79-93.
397. Supnet C. The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease // *Cell Calcium.* – 2010. – V. 47. – P. 183–189.
398. Swerdlow R.H. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer’s disease // *Med. Hypotheses.* – 2004. – V. 63. – P. 8–20.
399. Swerdlow R.H. The Alzheimer’s disease mitochondrial cascade hypothesis: Progress and perspectives // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* – 2014. – V. 1842. – P. 1219–1231.
400. Sy M. The 3xTg-AD mouse model: Reproducing and modulating plaque and tangle pathology / Sy M., Kitazawa M., Laferla F. // *Neuromethods* – 2011. – P. 482–496.
401. Szydlowska K. Calcium, ischemia and excitotoxicity // *Cell Calcium.* – 2010. – V. 47. – P. 122–129.
402. Takasugi N. The role of presenilin cofactors in the  $\gamma$ -secretase complex / Takasugi N., Tomita T., Hayashi I., Tsuruoka M., Niimura M., Takahashi Y., Thinakaran G., Iwatsubo T. // *Nature* – 2003. – V. 422. – P. 438 – 441.
403. Takeda S. Neuronal uptake and propagation of a rare phosphorylated high-molecular-weight tau derived from Alzheimer’s disease brain / Takeda

- S., Wegmann S., Cho H., DeVos S.L., Commins C., Roe A.D., Nicholls S.B., Carlson G.A., Pittstick R., Nobuhara C.K., Costantino I., Frosch M.P., Müller D.J., Irimia D., Hyman B.T. // *Nature Communications* – 2015. – V. 6. – P. 8490.
404. Takezawa R. A Pyrazole Derivative Potently Inhibits Lymphocyte Ca<sup>2+</sup> Influx and Cytokine Production by Facilitating Transient Receptor Potential Melastatin 4 Channel Activity / Takezawa R. // *Molecular Pharmacology* – 2006. – V. 69. – P. 1413–1420.
405. Theut, Riis P. Hidradenitis suppurativa patients have no increased risk of Alzheimer's disease // Theut Riis P., Egeberg A., Gislason G.H., Jemec G.B. // *Br J Dermatol.* – 2016. doi: 10.1111/bjd.15064
406. Tiraboschi P. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD / Tiraboschi P., Hansen L.A., Thal L.J., Corey-Bloom J. // *Neurology* – 2004. – V. 62. – P.1984–1989.
407. Tobe M. A novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation: structure-activity relationships and biological effects of 6-aminoquinazoline derivatives. / Tobe M., Isobe Y., Tomizawa H., Nagasaki T., Takahashi H., Hayashi H. // *Bioorganic & medicinal chemistry* – 2003. – V. 11. – P. 3869-3878.
408. Tobe, M. Simultaneous administration of 2-aminoethyl diphenylborinate and chloroquine reverses chloroquine resistance in malaria parasites / Tobe M., Isobe Y., Tomizawa H., Nagasaki T., Takahashi H., Hayashi H. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. V. 59. – P. 2890-2892.
409. Tomita T. Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer ' s disease treatment / Tomita T. // *Most* – 2009. – V. 9. – P. 661-679.
410. Toutzaris D. A novel giant peroxisomal superoxide dismutase motif-containing protein / Toutzaris D., Lewerenz J., Albrecht P., Jensen L.T., Letz J., Geerts A., Golz S., Methner A. // *Free Radical Biology and Medicine* – 2010. – V. 48. – P. 811–820.

411. Town T. Alternative Abeta immunotherapy approaches for Alzheimer's disease. / Town T. // *CNS & neurological disorders drug targets* – 2009. – V. 8. – P. 114-127.
412. Trevillyan J.M. Potent inhibition of NFAT activation and T cell cytokine production by novel low molecular weight pyrazole compounds. / Trevillyan J.M., Chiou X.G., Chen Y.W., Ballaron S.J., Sheets M.P., Smith M.L., Wiedeman P.E., Warrior U., Wilkins J., Gubbins E.J., Gagne G.D., Fagerland J., Carter G.W., Luly J.R., Mollison K.W., Djuric S.W. // *The Journal of biological chemistry* – 2001. – V. 276. – P. 48118–48126.
413. Troquier L. Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY22 mouse model: a suitable therapeutic approach. / Troquier L., Caillierez R., Burnouf S., Fernandez-Gomez F.J., Grosjean M.-E., Zommer N., Sergeant N., Schraen-Maschke S., Blum D., Buee L. // *Current Alzheimer research* – 2012. – V. 9. – P. 397-405.
414. Tshuva R.Y. ORAI1-dependent synaptic plasticity in rat hippocampal neurons / Tshuva R.Y., Korkotian E., Segal M. // *Neurobiology of Learning and Memory* – 2017. – V. 140. – P.1 – 10.
415. Tu H. Presenilins Form ER Ca<sup>2+</sup> Leak Channels, a Function Disrupted by Familial Alzheimer's Disease-Linked Mutations / Tu H., Nelson O., Bezprozvanny A., Wang Z., Lee S.F., Hao Y.H., Serneels L., Strooper B. De, Yu G., Bezprozvanny I. // *Cell* – 2006. – V.126. – P. 981–993.
416. Um J.W., A.C. Kaufman, M. Kostylev, J.K. Heiss, M. Stagi, H. Takahashi, M.E. Kerrisk, A. Vortmeyer, T. Wisniewski, A.J. Koleske, E.C. Gunther, H.B. Nygaard, S.M. Strittmatter. Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron*, 79 (2013), pp. 887–902
417. Um J.W. Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein / Um J.W., Kaufman A.C., Kostylev M., Heiss J.K., Stagi M., Takahashi H., Kerrisk M.E.,

- Vortmeyer A., Wisniewski T., Koleske A.J., Gunther E.C., Nygaard H.B., Strittmatter S.M. // *Neuron* – 2013. – V. 15. – P. 1227–1235.
418. Vadlamudi L. Genetics of temporal lobe epilepsy / Vadlamudi L., Scheffer I.E., Berkovic S.F. // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* – 2003. – V. 74. – P. 1359–1361
419. Valenzuela M. Can cognitive exercise prevent the onset of dementia? Systematic review of randomized clinical trials with longitudinal follow-up. / Valenzuela M., Sachdev P. // *The American journal of geriatric psychiatry: official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* – 2008. – V. 17. – P. 179–187.
420. Valenzuela M.J. Brain reserve and dementia: a systematic review / Valenzuela M.J., Sachdev P. // *Psychological Medicine* – 2005. – V. 36. – P. 441–454.
421. Van Alphen B. Drosophila strategies to study psychiatric disorders. / Alphen B. Van, Swinderen B. Van, Alphen B. van, Swinderen B. van // *Brain research bulletin* – 2011. – V. 92. – P. 1-11.
422. Van Alphen B. A Dynamic Deep Sleep Stage in Drosophila / Alphen B. van, Yap M.H.W., Kirszenblat L., Kottler B., Swinderen B. van // *Journal of Neuroscience* – 2013. – V. 33. – P. 6917-6927.
423. Van Cauwenberghe C. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives / Cauwenberghe C. Van, Broeckhoven C. Van, Sleegers K. // *Genetics in Medicine* – 2016. – V. 388. – P. 505-517.
424. Dam D. Van Drug discovery in dementia: the role of rodent models / Dam D. Van, Deyn P.P. De // *Nature Reviews Drug Discovery* – 2006. – V. 5. – P. 956–970.
425. Van Dam D. APP-based transgenic models: The APP23 model / Dam D. Van, Deyn P.P. De // *Neuromethods* – 2011. – P. 399–413.
426. Dam D. Van APP23 mice as a model of Alzheimer's disease: an example of a transgenic approach to modeling a CNS disorder. / Dam D. Van,

- Vloeberghs E., Abramowski D., Staufenbiel M., Deyn P.P.P. De // CNS spectrums – 2005.
427. Vardarajan B.N. Coding mutations in SORL1 and Alzheimer disease / Vardarajan B.N., Zhang Y., Lee J.H., Cheng R., Bohm C., Ghani M., Reitz C., Reyes-Dumeyer D., Shen Y., Rogaeva E., St George-Hyslop P., Mayeux R. // *Annals of Neurology* – 2015. – V. 77. – P. 215–227.
428. Vardy, E. Proteolytic mechanisms in amyloid-beta metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease / Vardy E. A. Catto, N. Hooper // *Trends Mol Med* – 2005. – V. 11. – N. 10. – P. 464-472.
429. Vartiainen S. Phenotypic rescue of a Drosophila model of mitochondrial ANT1 disease / Vartiainen S., Chen S., George J., Tuomela T., Luoto K.R., O'Dell K.M.C., Jacobs H.T. // *Disease Models & Mechanisms* – 2014. – V. 7. – P. 635–648.
430. Vellas B. Designing drug trials for Alzheimer's disease: What we have learned from the release of the phase III antibody trials: A report from the EU/US/ CTAD Task Force // *Alzheimer's Dement.* – 2013. – V. 9. – P. 438–444.
431. Venkiteswaran G. Intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry are required in Drosophila neurons for flight / Venkiteswaran G., Hasan G. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2009. – V. 106. – N. 25. – P. 10326–10331.
432. Vigont V. Both orai1 and TRPC1 are involved in excessive store-operated calcium entry in striatal neurons expressing mutant huntingtin exon 1 / Vigont V., Kolobkova Y., Skopin A., Zimina O., Zenin V., Glushankova L., Kaznacheeva E. // *Frontiers in Physiology* – 2015. – V. 24. – P. 337.
433. Vigont V.A. STIM1 protein activates store-operated calcium channels in cellular model of huntington's disease / Vigont V.A., Zimina O.A., Glushankova L.N., Kolobkova J.A., Ryazantseva M.A., Mozhayeva G.N., Kaznacheeva E. V. // *Acta Naturae* – 2014.

434. Villemagne V.L. Amyloid (beta) deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: A prospective cohort study / Villemagne V.L., Burnham S., Bourgeat P., Brown B., Ellis K., Salvado O., Szoeki C., Macaulay S., Martins R., Maruff P., Ames D., Rowe C., Masters C.L. // *The Lancet Neurology* – 2013. – V.12. – P. 357–367.
435. Villemagne V.L. Longitudinal assessment of A $\beta$  and cognition in aging and Alzheimer disease / Villemagne V.L., Pike K.E., Ch  telat G., Ellis K.A., Mulligan R.S., Bourgeat P., Ackermann U., Jones G., Szoeki C., Salvado O., Martins R., O'Keefe G., Mathis C.A., Klunk W.E., Ames D., Masters C.L., Rowe C.C. // *Annals of Neurology* – 2011. – V. 69. – P. 181–192.
436. Vincent I. Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? / Vincent I., Rosado M., Davies P. // *Journal of Cell Biology* – 1996. – V. 132. – P. 413–425.
437. Vonsattel, J.P. Huntington disease / Vonsattel J.P., M. DiFiglia. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* – 1998. – V. 57. – P. 369–384
438. Wahlster, L. Presenilin-1 adopts pathogenic conformation in normal aging and in sporadic Alzheimer's disease / Wahlster L., Arimon M., Nasser-Ghodsi N., Post K.L, Serrano-Pozo A., Uemura K., Berezovska O. // *Acta Neuropathol.* – 2013. – V. 125. – P. 187-99
439. Walker L.C. Neurodegenerative Diseases: Expanding the Prion Concept / Walker L.C., Jucker M. // *Annual Review of Neuroscience* – 2015. – V. 38. – P. 87–103.
440. Walsh D.M. A $\beta$  oligomers - A decade of discovery // *J. Neurochem.* – 2007. – V. 101. – P. 1172–1184.
441. Wang B. Gamma-secretase gene mutations in familial acne inversa. / Wang B., Yang W., Wen W., Sun J., Su B., Liu B., Ma D., Lv D., Wen Y., Qu T., Chen M., Sun M., Shen Y., Zhang X. // *Science (New York, N.Y.)* – 2010. – V. 330. – P. 1065.

442. Wang, R., Wild-type presenilin 1 protects against Alzheimer disease mutation-induced amyloid pathology / Wang R., Wang B., He W., Zheng H. // *J Biol Chem.* – 2006. – V. 281. – P. 15330–15336.
443. Watanabe, H. Inhibition of agonist-induced Ca<sup>2+</sup> entry in endothelial cells by myosin light-chain kinase inhibitor / Watanabe H., Takahashi R., Zhang X-X., Kakizawa H., Hayashi H., Ohno R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – V. 225. – P. 777–784.
444. Watanabe H. Indirect regulation of presenilins in CREB-mediated transcription / Watanabe H., Smith M.J., Heilig E., Beglopoulos V., Kelleher R.J., Shen J. // *Journal of Biological Chemistry* – 2009. – V. 284. – P. 13705-13713.
445. Watanabe N. Pen-2 is incorporated into the  $\gamma$ -secretase complex through binding to transmembrane domain 4 of presenilin 1 / Watanabe N., Tomita T., Sato C., Kitamura T., Morohashi Y., Iwatsubo T. // *Journal of Biological Chemistry* – 2005. – V. 280. – P. 41967 – 41975.
446. Reynaud E. A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity / Reynaud E. // *Nature Education* – 2010. – V. 414 – P. 212-216.
447. Wegierski T. Microscopic analysis of Orai-mediated store-operated calcium entry in cells with experimentally altered levels of amyloid precursor protein / Wegierski T., Gazda K., Kuznicki J. // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 2016. – V. 478. – P. 1087-1092.
448. Wei M. Molecular mechanisms underlying inhibition of STIM1-Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup> entry induced by 2-aminoethoxydiphenyl borate / Wei M., Zhou Y., Sun A., Ma G., He L., Zhou L., Zhang S., Liu J., Zhang S.L., Gill D.L., Wang Y. // *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* – 2016. – V. 468. – P. 2061-2074.
449. Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F.B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C.L., Beyreuther, K., and Evin, G. (2002). A Novel var epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid

- precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry* 41, 2825 – 2835.
450. Wiley J.C. Familial Alzheimer's disease mutations inhibit  $\gamma$ -secretase-mediated liberation of b-amyloid precursor protein carboxy-terminal fragment / Wiley J.C., Hudson M., Kanning K.C., Schechter L.C., Bothwell M. // *Journal of Neurochemistry*. – 2005. V. 94. – P. 1189–1201.
451. Willem, M.  $\eta$ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus / S. Tahirovic, M. Busche, S. Ovsepian, M. Chafai, S. Kootar, D. Hornburg, L. Evans, S. Moore, A. Daria, H. Hampel, V. Müller, C. Giudici, B. Nuscher, A. Wenninger-Weinzierl, E. Kremmer, M. Heneka, D. Thal, V. Giedraitis, L. Lannfelt, U. Müller, F. Livesey, F. Meissner, J. Herms, A. Konnerth, H. Marie, C. Haass // *Nature* – 2015. – V. 526. – N. 7573. – P. 443-447.
452. Williams R.T. Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. / Williams R.T., Manji S.S., Parker N.J., Hancock M.S., Stekelenburg L. Van, Eid J.P., Senior P. V, Kazenwadel J.S., Shandala T., Saint R., Smith P.J., Dziadek M. // *The Biochemical journal* – 2001. – V. 357 – P. 673–685.
453. Wischik C. Challenges in the conduct of disease-modifying trials in AD: Practical experience from a phase 2 trial of tau-aggregation inhibitor therapy / Wischik C., Staff R. // *Journal of Nutrition, Health and Aging* – 2009. – V. 13. – P. 367-369.
454. Wittmann C.W. Tauopathy in *Drosophila*: Neurodegeneration Without Neurofibrillary Tangles / Wittmann C.W. // *Science* – 2001. – V. 293. – P. 711–714.
455. Wolfe M.S. When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased A $\beta$ 42/A $\beta$ 40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease / Wolfe M.S. // *EMBO reports* – 2007. – V. 8. – P. 136-140.

456. Wolfe M.S. Tau mutations in neurodegenerative diseases // *J. Biol. Chem.* – 2009. V. 284. – P. 6021 – 6025.
457. Wolfe, M.S. gamma-Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease // *J. Neurochem.* – 2011 – V. 120. – P. 89 – 98.
458. Wolfe M.S. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. / Wolfe M.S., Xia W., Ostaszewski B.L., Diehl T.S., Kimberly W.T., Selkoe D.J. // *Nature* – 1999. – V. 398. P. 513 – 517.
459. Woodruff, G. The presenilin-1  $\Delta E9$  mutation results in reduced  $\gamma$ -secretase activity, but not total loss of PS1 function, in isogenic human stem cells / J.E. Young, F.J. Martinez, F. Buen, A. Gore, J. Kinaga, Z. Li, S.H. Yuan, K. Zhang, L.S. Goldstein // *Cell Rep.* – 2013. – V. 5. – P. 974–985.
460. Wu, J. Enhanced Store-Operated Calcium Entry Leads to Striatal Synaptic Loss in a Huntington's Disease Mouse Model / Wu J., Ryskamp D.A., Liang X., Egorova P., Zakharova O., Hung G., Bezprozvanny I. // *Journal of Neuroscience* – 2016. – V. 36. – P. 125-141.
461. Wu J. Neuronal Store-Operated Calcium Entry Pathway as a Novel Therapeutic Target for Huntington's Disease Treatment / Wu J., Shih H.-P., Vigont V., Hrdlicka L., Diggins L., Singh C., Mahoney M., Chesworth R., Shapiro G., Zimina O., Chen X., Wu Q., Glushankova L., Ahlijanian M., Koenig G., Mozhayeva G.N., Kaznacheeva E., Bezprozvanny I. // *Chemistry & Biology* – 2011. – V. 18. – P. 777-793.
462. Xia D. Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial alzheimer's disease / Xia D., Watanabe H., Wu B., Lee S.H., Li Y., Tsvetkov E., Bolshakov V.Y., Shen J., Kelleher R.J. // *Neuron* – 2015. – V. 85. – P. 967-81.
463. Xia J. Native store-operated calcium channels are functionally expressed in mouse spinal cord dorsal horn neurons and regulate resting calcium homeostasis / Xia J., Pan R., Gao X., Meucci O., Hu H. // *Journal of Physiology* – 2014. – V. 592. – P. 3443-3461.

464. Xu, X. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Potentiates CRAC Current by Directly Dilating the Pore of Open Orai1 / Xu X., Ali S., Li Y., Yu H., Zhang M., Lu J., Xu T. // *Sci Rep.* – 2016. – 29304.
465. Yan R. Presenilins are novel substrates for TRAF6-mediated ubiquitination / Yan R., Farrelly S., McCarthy J. V. // *Cellular Signalling* – 2013. – V. 25. – P. 1769–1779.
466. Yao J. Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease / Yao J., Irwin R.W., Zhao L., Nilsen J., Hamilton R.T., Brinton R.D. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2009. – V. 106. – P. 14670–14675.
467. Yap K.A.F. STIM2 regulates AMPA receptor trafficking and plasticity at hippocampal synapses / Yap K.A.F., Shetty M.S., Garcia-Alvarez G., Lu B., Alagappan D., Oh-Hora M., Sajikumar S., Fivaz M. // *Neurobiology of Learning and Memory* – 2016. – V. 138. – P. 54-61.
468. Ye L. Persistence of A $\beta$  seeds in APP null mouse brain / Ye L., Fritschi S.K., Schelle J., Obermüller U., Degenhardt K., Kaeser S.A., Eisele Y.S., Walker L.C., Baumann F., Staufenbiel M., Jucker M. // *Nature Neuroscience* – 2015. – V. 18. – P. 1559–1561.
469. Yeromin A. V. Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai / Yeromin A. V., Zhang S.L., Jiang W., Yu Y., Safrina O., Cahalan M.D. // *Nature* – 2006. – V. 443. – P. 226–229.
470. Yiannopoulou K.G. Current and future treatments for Alzheimer's disease / Yiannopoulou K.G., Papageorgiou S.G. // *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* – 2013. – V. 6. – P. 19-33.
471. Yoo A.S., Cheng I., Chung S., Grenfell T.Z., Lee H., Pack-Chung E., Handler M., Shen J., Xia W., Tesco G., Saunders A.J., Ding K., Frosch M.P., Tanzi R.E., Kim T.W. Presenilin-mediated modulation of capacitative calcium entry // *Neuron*. 2000. V. 27. P. 561-572.

472. Yoshikai S. et al. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene / Yoshikai S. et al. // *Gene* – 1990. – V. 87. – P. 257-263.
473. Yu, H. APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice / C. Saura, S. Choi, L. Sun, X. Yang, M. Handler, T. Kawarabayashi, L. Younkin, B. Fedeles, M. Wilson, S. Younkin, E. Kandel, A. Kirkwood, J. Shen // *Neuron* – 2001. – V. 31. – N. 5. – P. 713–726.
474. Yu J.-T. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease: From mechanisms to therapeutic opportunities. / Yu J.-T., Chang R.C.-C., Tan L. // *Progress in Neurobiology* (Amsterdam, Netherlands) – 2009. – V. 89. – P. 240–255.
475. Yuan J.P. SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels / Yuan J.P., Zeng W., Dorwart M.R., Choi Y.-J., Worley P.F., Muallem S. // *Nature Cell Biology* – 2009. – V. 11. – P. 337– 343.
476. Zahs K.R. More than a FAD: The invivo effects of disease-linked presenilin-1 mutations / Zahs K.R., Ashe K.H. // *Neuron* – 2015. – V. 85. – N. 5. – P. 893–895.
477. Zakharov S.I. Diethylstilbestrol is a potent inhibitor of store-operated channels and capacitative Ca(2+) influx. / Zakharov S.I., Smani T., Dobrydneva Y., Monje F., Fichandler C., Blackmore P.F., Bolotina V.M. // *Molecular pharmacology* – 2004. – V. 66. – P. 702–707.
478. Zamponi G.W. Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy // *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* – 2010. – V. 460. – P. 395-403.
479. Zeiger W. Ca<sup>2+</sup> Influx Through Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Channels Reduces Alzheimer Disease  $\beta$ -Amyloid Peptide Secretion. / Zeiger W., Vetrivel K.S., Buggia-Prevot V., Nguyen P.D., Wagner S.L., Villereal M.L., Thinakaran G. // *The Journal of biological chemistry* – 2013. – V. 288. – P. 26955-26966.

480. Zempel H. A. Oligomers Cause Localized Ca<sup>2+</sup> Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines / Zempel H., Thies E., Mandelkow E., Mandelkow E.-M. // *Journal of Neuroscience* – 2010. – V. 30. – P. 11938–11950.
481. Zeng W. STIM1 Gates TRPC Channels, but Not Orai1, by Electrostatic Interaction / Zeng W., Yuan J.P., Kim M.S., Choi Y.J., Huang G.N., Worley P.F., Muallem S. // *Molecular Cell* – 2008. – V. 32. – P. 439–448.
482. Zhang B. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. / Zhang B., Gaiteri C., Bodea L.-G., Wang Z., McElwee J., Podtelezchnikov A.A., Zhang C., Xie T., Tran L., Dobrin R., Fluder E., Clurman B., Melquist S., Narayanan M., Suver C., Shah H., Mahajan M., Gillis T., Mysore J., MacDonald M.E., Lamb J.R., Bennett D.A., Molony C., Stone D.J., Gudnason V., Myers A.J., Schadt E.E., Neumann H., Zhu J., Emilsson V. // *Cell* – 2013. – V. 153. – P. 707–720.
483. Zhang, C. Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release / Zhang C., Wu B., Beglopoulos V., Wines-Samuelson M., Zhang D., Dragatsis I., Südhof T. C., Shen J. // *Nature*. – 2009. – V. 460. – P. 632-636.
484. Zhang, D. Inactivation of presenilins causes pre-synaptic impairment prior to post-synaptic dysfunction / Zhang D., Zhang C., Ho A., Kirkwood A., Südhof T. C., Shen J. // *J Neurochem*. – 2010. – V. 115. – P. 1215-1221.
485. Zhang H. Discovery and structural optimization of 1-phenyl-3-(1-phenylethyl)urea derivatives as novel inhibitors of CRAC channel / Zhang H., Xu X., Chen H., Ali S., Wang D., Yu J., Xu T., Nan F. // *Acta Pharmacologica Sinica* – 2015. – V. 36. – P. 1137–1144.
486. Zhao W. Aging reduces glial uptake and promotes extracellular accumulation of A $\beta$  from a lentiviral vector / Zhao W., Zhang J., Davis E.G., William Rebeck G. // *Frontiers in Aging Neuroscience* – 2014. – V. 210.
487. Zheng L. Auto-inhibitory role of the EF-SAM domain of STIM proteins in store-operated calcium entry. / Zheng L., Stathopoulos P.B., Schindl R., Li

- G.-Y., Romanin C., Ikura M. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2011. – V. 108. – P. 1337–1342.
488. Zhou Y. The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels / Zhou Y., Mancarella S., Wang Y., Yue C., Ritchie M., Gill D.L., Soboloff J. // Journal of Biological Chemistry – 2009. – V. 284. – P. 19164–19168.
489. Zhou, Q. Impairment of PARK14-dependent Ca(2+) signalling is a novel determinant of Parkinson's disease / A. Yen, G. Rymarczyk, H. Asai, C. Trengrove, N. Aziz, M.T. Kirber, G. Mostoslavsky, T. Ikezu, B. Wolozin, V.M. Bolotina // Nat Commun. – 2016. – V. 7. – P. 10332.
490. Zhu X. Mitochondrial abnormalities and oxidative imbalance in Alzheimer disease. / Zhu X., Perry G., Moreira P.I., Aliev G., Cash A.D., Hirai K., Smith M. // Journal of Alzheimer's disease. – 2006. – V. 9. – P. 147–153.



