

УДК 577.352.465

ДЕПО-ЗАВИСИМЫЙ ВХОД КАЛЬЦИЯ В КЛЕТКИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА SK-N-SH, МОДЕЛИРУЮЩИЕ БОЛЕЗНЬ ХАНТИНГТОНА

© 2012 г. В. А. Вигонт¹, О. А. Зими́на¹, Л. Н. Глушанкова¹, И. Б. Безпрозванный²,
Г. Н. Можяева¹, Е. В. Казначеева^{1*}

¹Учреждение Российской академии наук Институт цитологии РАН,
Тихорецкий пр., 4, Санкт-Петербург, 194064, Россия;

*электронная почта: evkazn@mail.cytspb.rssi.ru

²Отдел физиологии Юго-западного медицинского центра Техасского университета в Далласе, 75390 США
Поступила в редакцию 19.08.2011 г.

Болезнь Хантингтона – аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, обусловленное мутацией в гене белка хантингтина, которая приводит к увеличению длины полиглутаминового тракта в N-концевой области белка. При данном заболевании прежде всего страдают срединные шипиковые нейроны (СШН) стриатума. В качестве клеточной модели болезни Хантингтона использовали клетки нейроblastомы человека SK-N-SH, трансфицированные конструкцией для экспрессии мутантного хантингтина (Htt138Q). Показано, что экспрессия Htt138Q вызывает увеличение депо-зависимого кальциевого входа в клетках SK-N-SH. Также показано, что соединение EVP4593 способно осуществлять обратимый блок аномального депо-зависимого ответа, а сам ответ, по-видимому, опосредован каналами, несущими в своем составе субъединицу TRPC1 (short transient receptor potential channel 1).

Ключевые слова: болезнь Хантингтона, нейродегенерация, кальций, SOC, TRPC1.

Болезнь Хантингтона является аутосомно-доминантным нейродегенеративным заболеванием, вызванным увеличением количества глутамин-кодирующих повторов в первом экзоне гена белка хантингтина. В норме длина полиглутаминового тракта не должна превышать 35 остатков глутамина (Htt), в то время как у больных длина тракта может достигать 36–100 и даже более остатков глутамина (Htt^{exp}). При болезни Хантингтона в первую очередь поражаются срединные шипиковые нейроны (СШН) стриатума [1]. Тем не менее, связь между Htt^{exp} и дегенерацией нейронов до сих пор остается неясной.

Одна из гипотез, объясняющих развитие патологических состояний при болезни Хантингтона, заключается в том, что Htt^{exp} нарушает кальциевую сигнализацию, что, в конечном итоге, приводит к клеточной гибели. Ранее показано, что Htt^{exp} усиливает функцию рецептора NMDA [2], а также увеличивает сродство внутриклеточного рецептора IP₃ к лиганду [3]. В обоих случаях наблюдалось повышение концентрации свободного кальция в цитозоле: в первом случае за счет увеличенного входа кальция из внешней среды через рецептор NMDA в ответ на небольшие концентрации глутамата, освобождаемые нейронами кортикостриатальной проекции; во втором за счет опустошения внутриклеточного кальциевого депо в ответ на базальные концентрации IP₃ в ци-

тозоле. Повышение уровня цитозольного кальция ведет к аномальному накоплению кальция в митохондриях, патологическому запуску кальций-зависимых сигнальных путей, апоптотической активности и дегенерации нейронов стриатума [4, 5].

Одним из механизмов повышения концентрации ионов кальция в нейронах является вход кальция через депо-управляемые каналы плазматической мембраны [6]. Целью данной работы было изучение влияния Htt^{exp} на депо-зависимый вход ионов кальция в клетках нейроblastомы человека SK-N-SH.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки. Клетки нейроblastомы человека SK-N-SH из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН культивировали в среде DMEM с добавлением 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота и антибиотика (80 мкг/мл гентамицина). За 1–2 дня до начала эксперимента клетки высевали на фрагменты покровных стекол (3 × 3 мм). Для лучшей адгезии клеток стекла покрывали 0.01% раствором полилизина.

Соединения EVP. EVP4593 (6-амино-4-(4-феноксифенетиламино)хиназолин) и EVP14808 (6-амино-4-(2-(3-пиридил)этиламино)хиназолин) описа-

ны в опубликованных ранее работах [7, 8]. Соединения EVP любезно предоставлены компанией EnVivo Inc (США).

Трансфекция и РНК интерференция. Мутантный хантингтин экспрессировали в клетках SK-N-SH с использованием конструкции на основе вектора сPI (Promega, США), содержащей Htt138Q (последовательность, кодирующая белок хантингтин с 138 остатками глутамина). Htt138Q встраивали в вектор сPI, обладающий устойчивостью к неомицину, по XbaI/EcoRI-сайтам. В контрольных экспериментах использовали плазмиду сPI, содержащую Htt15Q (последовательность, кодирующая нормальный хантингтин с 15 остатками глутамина). Трансфицированные клетки визуализировали при помощи котрансфекции с зеленым флуоресцентным белком (GFP) (соотношение Htt : GFP = 3 : 1). Котрансфекцию проводили с использованием трансфицирующего агента Унифектин56 (ИБХ, Москва).

В экспериментах с подавлением экспрессии TRPC1 (short transient receptor potential channel 1) использовали котрансфекцию клеток конструкцией для экспрессии хантингтина, плазмидой, несущей малую интерферирующую РНК (siRNA) против TRPC1 (pSHAG-1h TRPC1 2219, любезно предоставлена Dr. L. Tsiokas, University of Oklahoma Health Science Center) и плазмидой, кодирующей GFP, в соотношении 3 : 3 : 2.

Для гиперэкспрессии TRPC1 в клетках SK-N-SH использовали котрансфекцию клеток геном *Trpc1* мыши в составе экспрессионного вектора pсDNA3 (конструкция любезно предоставлена Dr. S. Muallem, NIH, США) и плазмидой, кодирующей GFP, в соотношении 1 : 1.

В контрольных экспериментах использовали плазмиду с siRNA, не имеющей специфической мишени (контрольная siRNA, Sigma, США) и пустой экспрессионный (контрольный) вектор (Sigma, США).

Электрофорез и иммуноблотинг. Клетки выращивали в чашках Петри диаметром 50 мм. После трансфекции клетки лизировали в буферном растворе следующего состава: 10 мМ трис-HCl pH 7.5, 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 1% NP40 (Nonidet P40, неионный детергент нонилфенилполиэтиленгликоль), 2 мМ EDTA, 0.2 мМ PMSF (ингибитор сериновых протеаз, фенилметансульфонилфторид) с добавлением ингибиторов протеаз (PIC, Hoffmann-La Roche AG, Германия). Белки лизатов разделяли электрофоретически в 8% полиакриламидном геле в вертикальной камере и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Белки на иммуноблоте выявляли с использованием поликлональных антител против TRPC1 (Alomone labs, Израиль, в разведении 1 : 200). В качестве вторых антител брали антитела козы против константной части иммуноглобулинов

кролика (1 : 30000). Белки на иммуноблоте выявляли с помощью субстрата Super Signal Chemiluminescent Substrate (Pierce, США). Эксперименты повторяли как минимум 3 раза, используя различные лизаты клеток. Для контроля равной загрузки дорожек использовали моноклональные антитела против α -тубулина в разведении 1 : 1000 (Sigma, США). Процентное содержание белка сравнивали с помощью стандартной программы сравнения интенсивности окрашивания сканированного иммуноблота.

Электрофизиологические измерения. Ионные токи регистрировали с использованием метода локальной фиксации потенциала в условиях регистрации тока от целой клетки [9]. Измерения выполняли с помощью усилителя Axopatch 200B (Axon Instruments, США). Сопротивление микроэлектродов составляло 5–15 МОм. Последовательное сопротивление не компенсировали. Усиленный и предварительно отфильтрованный встроенным в усилитель двухполюсным фильтром Бесселя (частота среза 500 Гц) сигнал оцифровывали на частоте 5000 Гц с помощью платы АЦП L305 (L-Card, Россия). При записях интегральных токов клетки потенциал мембраны поддерживали при -40 мВ. Периодически (каждые 5 с) потенциал на мембране изменяли до -100 мВ (на 30 мс), а затем постепенно (с постоянной скоростью 1 мВ/мс) его величину изменяли до $+100$ мВ. Шаг измерения составлял 0.5 мВ. Записанные токи нормировали относительно емкости клетки (10–30 пФ). Записи, полученные до активации исследуемых токов, использовали для вычитания тока утечки и тока через другие каналы.

Растворы. В измерениях тока целой клетки раствор регистрирующей пипетки содержал (в мМ): 135 CsCl, 10 EGTA-Cs, 10 HEPES-Cs, 4.5 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 4 Na-ATP, 0.4 Na₂-GTP (pCa7), pH 7.3. Внеклеточный раствор содержал (в мМ): 140 NMDG-Asp, 10 BaCl₂, 10 HEPES-Cs, 0.01 тетродоксина, 0.01 нифедипина, pH 7.3. Для активации депо-зависимых токов во внеклеточный раствор добавляли 1 мкМ тапсигаргина. EVP4593 и EVP14808 добавляли во внеклеточный раствор. Соединения подавали к объекту путем перфузии. Время замены раствора в камере составляло менее 1 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Чтобы смоделировать болезнь Хантингтона в клетки нейробластомы человека SK-N-SH вводили конструкцию, кодирующую белок хантингтин с полиглутаминовым трактом из 138 остатков глутамина (Htt138Q). Контролем служили интактные клетки (Ctrl) и клетки, экспрессирующие хантингтин с полиглутаминовым трактом из 15 остатков глутамина (Htt15Q).

Рис. 1. Влияние экспрессии белков Htt15Q и Htt138Q на депо-управляемый вход кальция в клетках SK-N-SH.

a – Развитие тока (отнесенного к емкости клетки), вызванное приложением 1 мкМ тапсигаргина в клетках SK-N-SH, экспрессирующих Htt15Q (белые треугольники); Htt138Q (серые круги) и интактных SK-N-SH (Ctrl) (черные квадраты) при потенциале -80 мВ. Представлены данные трех репрезентативных экспериментов.

b – Средние вольт-амперные характеристики токов, полученных при пассивном опустошении депо тапсигаргином (1 мкМ), в клетках SK-N-SH, экспрессирующих Htt15Q (светло-серая линия); Htt138Q (темно-серая линия) и интактных SK-N-SH (Ctrl) (черная линия) на стационарном уровне активности исследуемых токов. Количество экспериментов указано на панели (*n*).

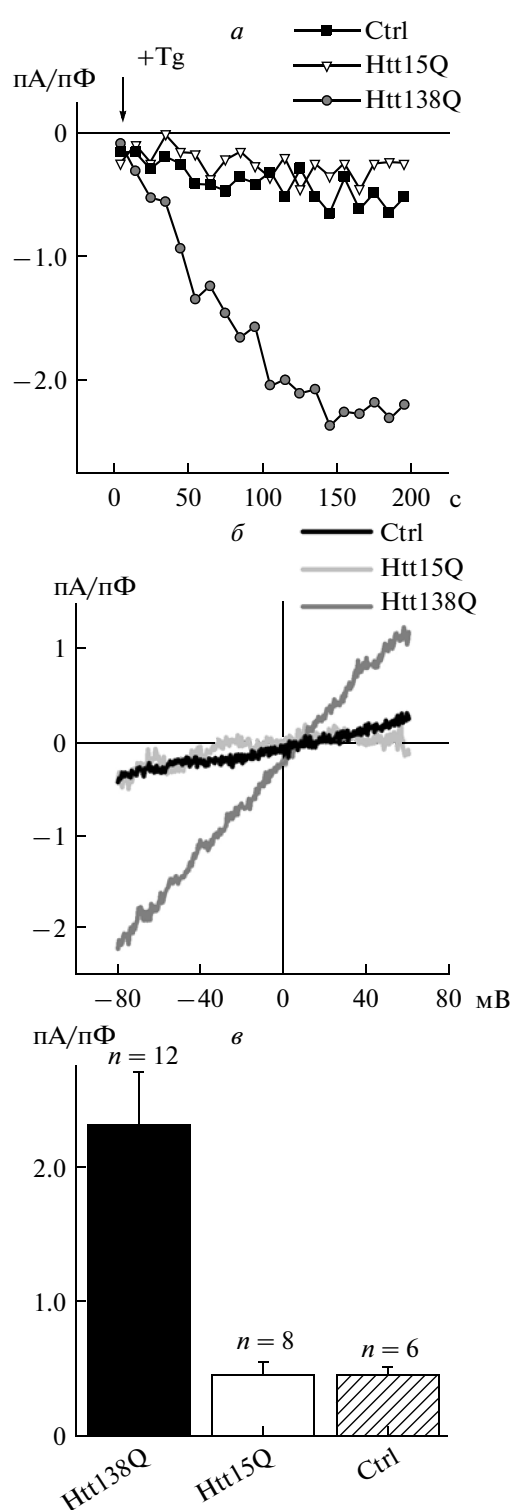
в – Стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале -80 мВ в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в клетках SK-N-SH, экспрессирующих Htt15Q (без заливки); Htt138Q (черная заливка) и интактных SK-N-SH (Ctrl) (наклонная штриховка). Уровень достоверности при статистически отличающихся результатах составляет $p < 0.05$.

Электрофизиологические опыты показали, что примерно у 80% интактных клеток в ответ на пассивное опустошение депо тапсигаргином развивался входящий ток со средней амплитудой 0.5 пА/пФ при потенциале -80 мВ (рис. 1*a–в*). В клетках Htt15Q средняя амплитуда тока была практически такой же, как в интактных клетках (рис. 1*a–в*). В то же время регистрация депо-зависимого входа ионов кальция в клетки Htt138Q, служащие моделью болезни Хантингтона, показала приблизительно 5-кратное увеличение тока по сравнению с контролем (рис. 1*a–в*). Так же, как и в опытах на интактных клетках, приблизительно в 20% опытов не наблюдалось никакой реакции на аппликацию тапсигаргина к клеткам Htt15Q и Htt138Q.

Поскольку считается, что аппликация тапсигаргина ведет к пассивному опустошению депо и не влияет на другие клеточные сигнальные пути, зарегистрированный ток можно приписать работе депо-управляемых каналов. Таким образом, мы показали, что в клетках Htt138Q, моделирующих болезнь Хантингтона, наблюдается аномальный депо-зависимый вход кальция.

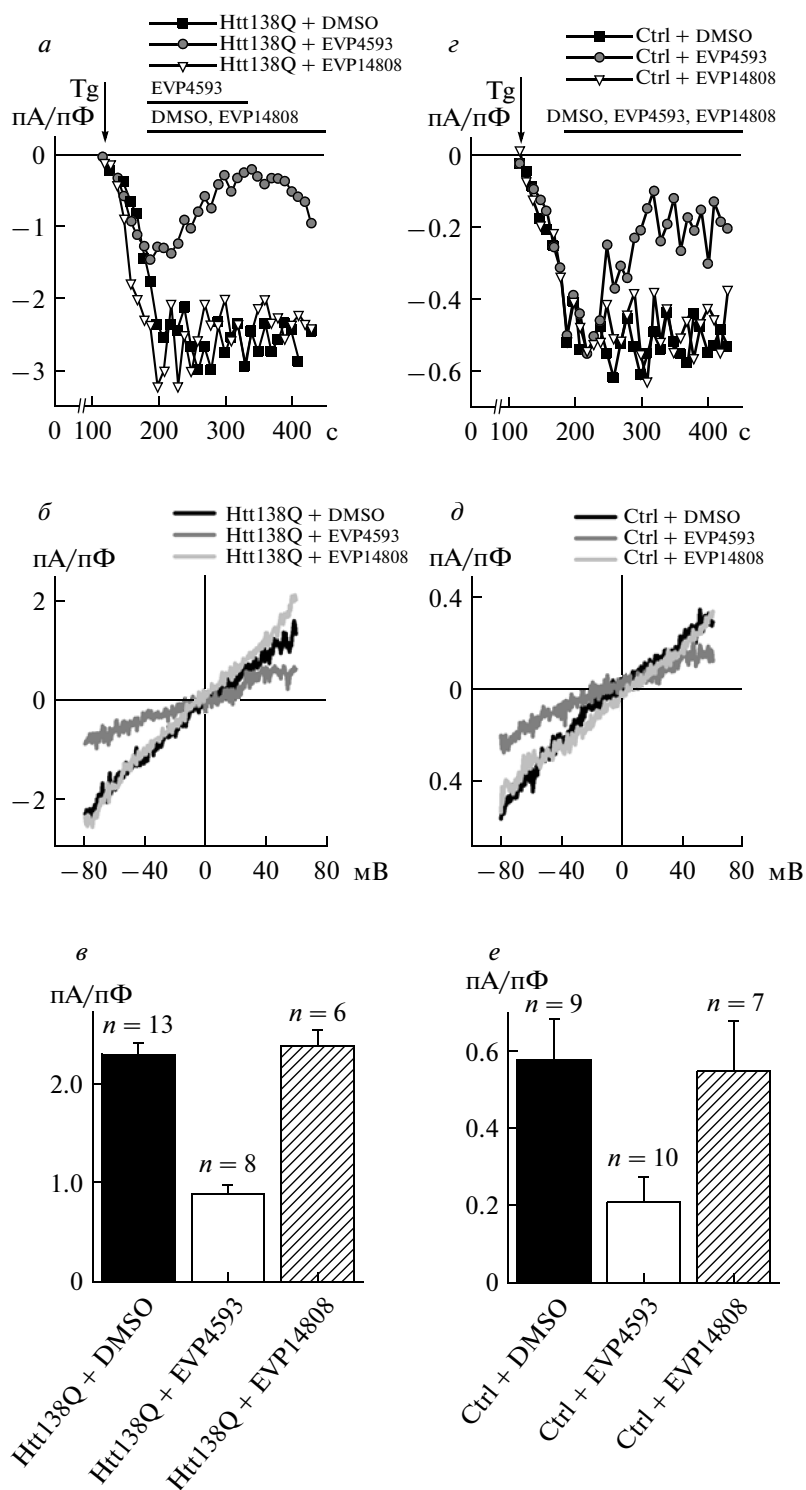
В 2003 г. Tobe и соавт. синтезировали структурные аналоги киназолина (соединения EVP) и показали их способность ингибировать сигнальный путь NF-κB [7, 8]. В работах Okamura и Rao, а также Stankunas и соавт. показали тесную связь между активацией NF-AT и NF-κB-подобных молекул T-лимфоцитов и депо-зависимым входом кальция [10, 11]. Таким образом, возможно, что действие EVP на NF-κB опосредовано влиянием EVP на депо-зависимый кальциевый вход.

Следующей задачей стало исследование влияния EVP4593 и его неактивного аналога EVP14808



на депо-зависимый вход кальция в клетках Htt138Q.

Результаты электрофизиологических экспериментов показали, что добавление 300 нМ EVP4593 приводит к выраженному уменьшению амплитуды (примерно на 60%) депо-зависимых токов, вызванных аппликацией 1 мкМ тапсигар-



гина в клетках Htt138Q (рис. 2а–е). Следует подчеркнуть обратимость этого уменьшения: при отмывке EVP4593 восстанавливалась активность депо-зависимых каналов (рис. 2а). В то же время, добавление неактивного EVP14808 не оказывало статистически значимого влияния на токи в клетках Htt138Q (рис. 2а–е). Тапсигаргин и EVP рас-

творимы в DMSO, поэтому, чтобы исключить влияние растворителя, были поставлены контрольные опыты. В них использовали клетки Htt138Q, в которых ток вызывали с помощью тапсигаргина, а затем добавляли внеклеточный раствор с тапсигаргином, содержащий DMSO в такой же концентрации, как и в опытах с EVP. Ни-

Рис. 2. Влияние соединений EVP на депо-управляемые токи в клетках SK-N-SH и Htt138Q.

a – Развитие тока (отнесенного к емкости клеток), вызванное приложением 1 мкМ тапсигаргина в клетках Htt138Q при потенциале -80 мВ при добавлении во внешний раствор 0.3% DMSO (Htt138Q + DMSO) (черные квадраты); 300 нМ EVP14808 (Htt138Q + EVP14808) (белые треугольники); 300 нМ EVP4593 (Htt138Q + EVP4593) (серые круги). Время добавления во внешний раствор EVP4593, EVP14808 и DMSO показано линиями над графиком. Представлены данные трех репрезентативных экспериментов.

b – Средние вольт-амперные характеристики токов, полученных при пассивном опустошении депо тапсигаргином (1 мкМ), в клетках Htt138Q на стационарном уровне развития токов при добавлении во внешний раствор 0.3% DMSO (Htt138Q + DMSO) (черная линия); 300 нМ EVP14808 (Htt138Q + EVP14808) (светло-серая линия); 300 нМ EVP4593 (Htt138Q + EVP4593) (темно-серая линия). Количество экспериментов указано на панели (*e*).

в – Стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале -80 мВ в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в клетках Htt138Q при добавлении во внешний раствор 0.3% DMSO (Htt138Q + DMSO) (черная заливка); 300 нМ EVP14808 (Htt138Q + EVP14808) (наклонная штриховка); 300 нМ EVP4593 (Htt138Q + EVP4593) (без заливки). Уровень достоверности при статистически отличающихся результатах составляет $p < 0.05$.

г – Развитие тока (отнесенного к емкости клеток), вызванное приложением 1 мкМ тапсигаргина в контрольных клетках SK-N-SH при потенциале -80 мВ при добавлении во внешний раствор 0.3% DMSO (Ctrl + DMSO) (черные квадраты); 300 нМ EVP14808 (Ctrl + EVP14808) (белые треугольники); 300 нМ EVP4593 (Ctrl + EVP4593) (серые круги). Время добавления во внешний раствор EVP4593, EVP14808 и DMSO показано линией над графиком. Представлены данные трех репрезентативных экспериментов.

д – Средние вольт-амперные характеристики токов, полученных при пассивном опустошении депо 1 мкМ тапсигаргина, в контрольных клетках SK-N-SH на стационарном уровне развития токов при добавлении во внешний раствор 0.3% DMSO (Ctrl + DMSO) (черная линия); 300 нМ EVP14808 (Ctrl + EVP14808) (светло-серая линия); 300 нМ EVP4593 (Ctrl + EVP4593) (темно-серая линия). Количество экспериментов указано на панели (*e*).

e – Стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале -80 мВ, в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в контрольных клетках SK-N-SH при добавлении во внешний раствор 0.3% DMSO (Ctrl + DMSO) (черная заливка); 300 нМ EVP14808 (Ctrl + EVP14808) (наклонная штриховка); 300 нМ EVP4593 (Ctrl + EVP4593) (без заливки). Уровень достоверности при статистически отличающихся результатах составляет $p < 0.05$.

каких эффектов, связанных с влиянием DMSO не наблюдали (рис. 2*a–e*). Таким образом, EVP4593 блокировал аномальный депо-зависимый кальциевый вход в клетках Htt138Q.

Аналогичные серии экспериментов были проведены и на интактных клетках SK-N-SH. Хотя амплитуда тапсигаргин-индуцированных токов в контрольных клетках была существенно ниже, чем в клетках Htt138Q, в них EVP4593 так же приводил к уменьшению депо-зависимых токов (примерно на 64%), а EVP14808 не влиял на депо-зависимый кальциевый вход (рис. 2*г–e*).

Исходя из того, что EVP4593 способен воздействовать на тапсигаргин-индуцируемые токи как в клетках Htt138Q, так и в интактных клетках SK-N-SH, можно предположить, что EVP4593 является новым ингибитором депо-зависимого кальциевого входа.

Следующим этапом стало определение роли каналаобразующего белка TRPC1 в аномальном депо-зависимом кальциевом ответе в клетках Htt138Q. Белок TRPC1 относится к белкам семейства TRP, представители которого содержат шесть трансмембранных доменов и могут гомоили гетероолигомеризоваться с формированием ионной поры канала. Большинство каналов, образованные белками этого семейства, относительно неселективны для катионов [12]. Показано, что TRPC1 может принимать участие в депо-зависимом входе кальция в клетках различного типа [13–15]. Также показано, что TRPC1 экспрессируется в клетках нервной системы [16].

С помощью siRNA была подавлена экспрессия белка TRPC1 в клетках Htt138Q примерно на 70%.

Эндогенная экспрессия TRPC1 в линии клеток SK-N-SH и эффективность супрессии подтверждена с помощью иммуноблота (рис. 3*a*). Амплитуда тапсигаргин-индуцированных токов в клетках Htt138Q с подавленной экспрессией TRPC1 (Htt138Q TRPC1(–)) при потенциале -80 мВ составила примерно 0.8 пА/пФ и стала сравнима с амплитудой аналогичных токов в клетках SK-N-SH, несущих контрольную siRNA (Ctrl + ctrl siRNA, рис. 3*б, в, д*). В сравнении с токами, которые развиваются в клетках Htt138Q, трансфицированных контрольной siRNA (Htt138Q + ctrl siRNA), амплитуда токов в клетках Htt138Q TRPC1(–) снизилась примерно на 65%. (рис. 3*б, в, д*). Это дало возможность предположить, что каналы, имеющие в своем составе субъединицу TRPC1, опосредуют аномальный депо-зависимый ответ в клетках Htt138Q.

Дальнейшие эксперименты были направлены на изучение влияния EVP4593 на депо-зависимый ответ в клетках Htt138Q TRPC1(–). EVP4593 также воздействовал на депо-зависимые токи в этих клетках, но степень угнетения токов (примерно на 30%) была меньше, нежели в клетках Htt138Q (на 60%) (рис. 2*в*, рис. 3*б, в*). Полученные данные позволили предположить, что именно белок TRPC1 служит непосредственной молекулярной мишенью для EVP4593.

Если указанное предположение верно, то EVP4593 должен блокировать гомоолигомерные каналы, состоящие только из субъединиц TRPC1. Для проверки этого предположения мы гиперэкспрессировали белок TRPC1 мыши в контрольных клетках SK-N-SH (Ctrl TRPC1(+)).

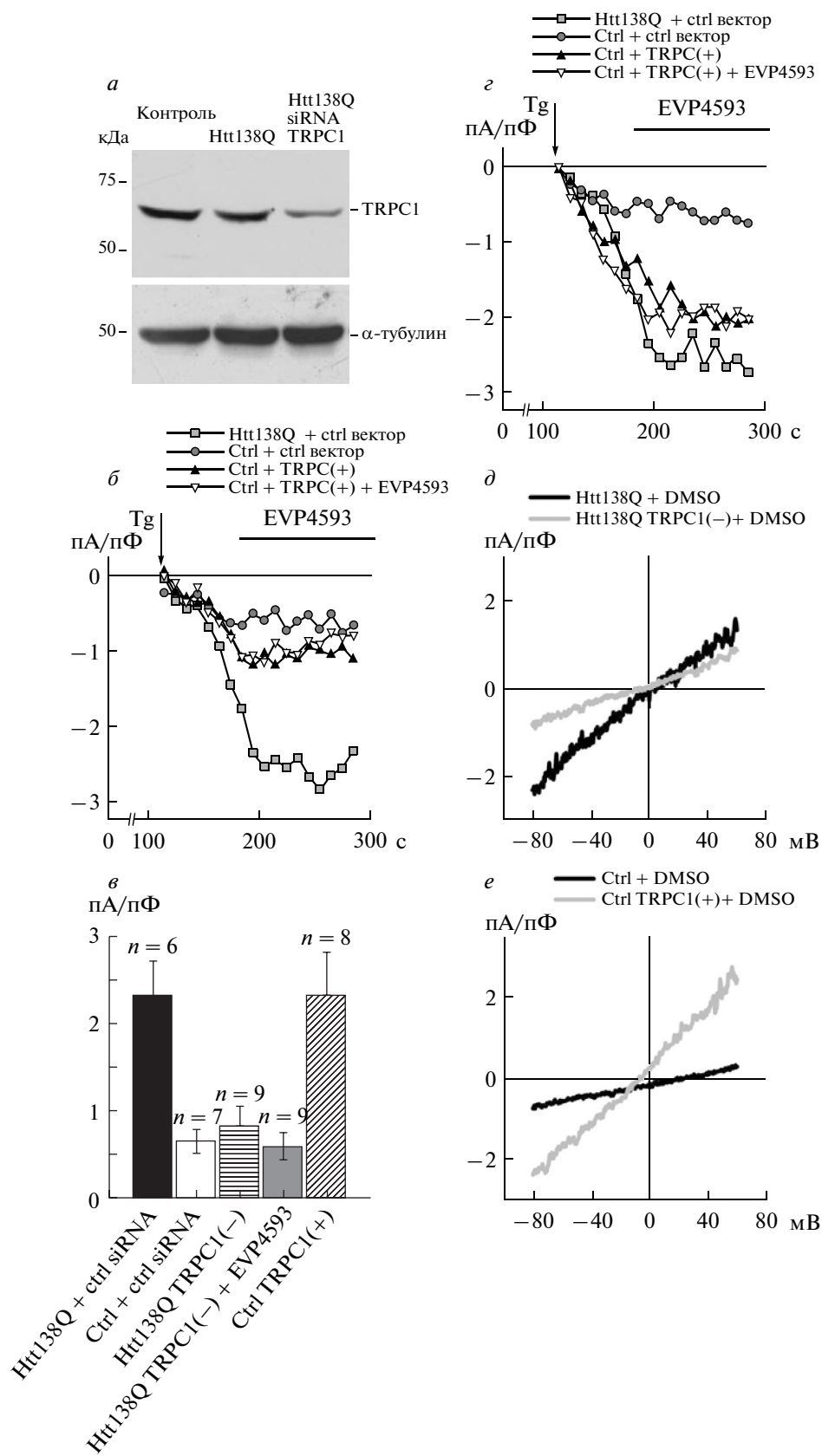


Рис. 3. Влияние уровня экспрессии TRPC1 на депо-управляемые токи кальция в клетках SK-N-SH и Htt138Q.

a – Иммуноблот, показывающий уровень экспрессии TRPC1 в контрольных клетках SK-N-SH (Control); в клетках Htt138Q и в клетках Htt138Q, экспрессирующих плазмиду, несущую siRNA против TRPC1 (Htt138Q siRNA TRPC1).

б – Развитие тока (отнесенного к емкости клеток), вызванное приложением 1 мкМ тапсигаргина при потенциале -80 мВ в клетках Htt138Q, трансфицированных контрольной siRNA (Htt138Q + ctrl siRNA) (светло-серые квадраты); трансфицированных siRNA против TRPC1 (Htt138Q TRPC1(-)) (черные треугольники); трансфицированных siRNA против TRPC1 при добавлении во внешний раствор 300 нМ EVP4593 (Htt138Q TRPC1(-) + EVP4593) (белые треугольники); в контрольных клетках SK-N-SH, трансфицированных контрольной siRNA (Ctrl + ctrl siRNA) (темно-серые круги). Время добавления во внешний раствор EVP4593 показано линией над графиком. Представлены данные четырех репрезентативных экспериментов.

в – Стационарный уровень развития депо-управляемых токов при потенциале -80 мВ в ответ на подачу 1 мкМ тапсигаргина в клетках Htt138Q, экспрессирующих контрольную siRNA (Htt138Q + ctrl siRNA) (черная заливка); siRNA против TRPC1 (Htt138Q TRPC1(-)) (горизонтальная штриховка); siRNA против TRPC1 при добавлении во внешний раствор 300 нМ EVP4593 (Htt138Q TRPC1(-) + EVP4593) (серая заливка); в контрольных клетках SK-N-SH, несущих контрольную siRNA (Ctrl + ctrl siRNA) (без заливки); плазмиду для гиперэкспрессии TRPC1 (Ctrl TRPC1(+)) (наклонная штриховка) Уровень достоверности при статистически отличающихся результатах составляет $p < 0.05$.

г – Развитие тока (отнесенного к емкости клеток), вызванное приложением 1 мкМ тапсигаргина при потенциале -80 мВ в контрольных клетках SK-N-SH, трансфицированных контрольным вектором (Ctrl + ctrl vector) (темно-серые круги); трансфицированных плазмидой, обеспечивающей гиперэкспрессию TRPC1 (Ctrl TRPC1(+)) (черные треугольники); трансфицированных плазмидой, обеспечивающей гиперэкспрессию TRPC1 при добавлении во внешний раствор 300 нМ EVP4593 (Ctrl TRPC1(+) + EVP4593) (белые треугольники); в клетках Htt138Q, экспрессирующих контрольный вектор (Htt138Q + ctrl vector) (светло-серые квадраты). Время добавления во внешний раствор EVP4593 показано линией над графиком. Представлены данные четырех репрезентативных экспериментов.

д – Средние вольт-амперные характеристики токов, полученных при пассивном опустошении депо 1 мкМ тапсигаргина, на стационарном уровне развития токов при добавлении во внешний раствор 0.3% DMSO в клетках Htt138Q (Htt138Q + DMSO) (черная линия); в клетках Htt138Q, экспрессирующих siRNA против TRPC1 (Htt138Q TRPC1(-) + DMSO) (светло-серая линия).

е – Средние вольт-амперные характеристики, полученные при пассивном опустошении депо 1 мкМ тапсигаргина на стационарном уровне развития токов при добавлении во внешний раствор 0.3% DMSO в контрольных клетках SK-N-SH (Ctrl + DMSO) (черная линия); в контрольных клетках SK-N-SH, с гиперэкспрессией TRPC1 (Ctrl TRPC1(+) + DMSO) (светло-серая линия).

Депо-зависимые токи в клетках Ctrl TRPC1(+), индуцированные тапсигаргином, имели практически такую же амплитуду при потенциале -80 мВ

(2.1 пА/пФ), как и токи в клетках Htt138Q (рис. 3*в*, *г*). Однако детальное сравнение этих токов показало значительное расхождение в вольт-амперных характеристиках, особенно заметное в области положительных потенциалов (рис. 3*д*, *е*). Иммуноблот с антителами против TRPC1 также продемонстрировал, что в клетках Htt138Q уровень экспрессии TRPC1 не выше, чем в интактных клетках SK-N-SH (рис. 3*а*).

Показано, что депо-зависимые токи в клетках Ctrl TRPC1(+) не блокируются EVP4593 в концентрации 300 нМ (рис. 3*в*, *г*). В дальнейшем установили, что увеличение концентрации EVP4593 в 10 и в 100 раз не влияло на тапсигаргин-индуцированные токи в клетках Ctrl TRPC1(+) (данные не представлены). Таким образом, можно сделать заключение, что TRPC1 не является непосредственной молекулярной мишенью для EVP 4593. Из представленных опытов следует, что EVP4593 способен подавлять активность каналов, включающих TRPC1 как одну из субъединиц, но не гомоолигомерных каналов, состоящих исключительно из TRPC1.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы прежде всего исследовали связь между Htt^{exp} и дестабилизацией кальциевой сигнализации, наблюдаемой при болезни Хантингтона. В частности, изучали вопросы о том, какие пути могут быть вовлечены в эту дестабилизацию, и какие белки могут играть ключевые роли в развитии патологии.

В ранее опубликованных работах показано, что Htt^{exp} способен усиливать функцию NR2B-содержащего рецептора NMDA [17–19], увеличивать кальциевый ответ в СШН (срединные шипиковые нейроны) за счет повышения чувствительности IP₃-рецептора к IP₃ [3], а также за счет дестабилизации регуляции митохондриального кальция [4, 5].

Результаты наших экспериментов показали, что в клетках нейроblastомы человека SK-N-SH экспрессия мутантного хантингтина (Htt138Q) приводит к значительному повышению входа кальция по депо-зависимому пути. Важно отметить, что подобное повышение связано именно с увеличением длины полиглутаминового тракта хантингтина, так как экспрессия плазмиды, кодирующей Htt15Q, не влияла на тапсигаргин-индуцированные токи (рис. 1*а–в*).

Усиление функции депо-зависимых каналов может быть как прямым результатом экспрессии мутантного хантингтина, так и относиться к компенсаторному действию клетки в ответ на деста-

билизацию кальциевой сигнализации. С прямым действием Htt^{exp} можно связать, например, изменение проводящих свойств исследуемых каналов. Компенсаторное воздействие может характеризоваться увеличением числа депо-управляемых каналов вследствие нарушения экспрессии каналобразующих белков из-за общей дестабилизации кальциевой сигнализации. Некоторые наши данные позволяют считать предпочтительной вторую гипотезу [20], однако для окончательного ответа на данный вопрос необходимы дополнительные исследования.

В дальнейшем наша работа была направлена на изучение депо-зависимого входа кальция как потенциальной терапевтической мишени при болезни Хантингтона. Получив аномальный кальциевый ответ в клетках Htt138Q, представлялось важным найти способ снизить этот ответ до уровня контрольных значений. С этой целью исследовали действие агента EVP4593 на тапсигаргин-индуцированные токи.

Изначально это соединение было выделено как ингибитор РМА/РНА-индуцированной активации сигнального пути NF-κB в клетках Jurkat [8]. Считается, что сигнальный путь NF-κB может играть непосредственную роль в патогенезе болезни Хантингтона. Действительно, активацию NF-κB наблюдали в клетках PC12, трансфицированных конструкцией, кодирующей мутантный хантингтин [21], причем ингибирование активности NF-κB уменьшало повреждение стриатума в модели острой эксайтотоксичности [22–24]. Показано, что мутантный хантингтин может взаимодействовать с ИКК (I-κB Kinase) с усилением ее киназной активности. Блок этой активности позволял клеткам НЕК293 выживать при индукции клеточной гибели с помощью мутантного хантингтина [21]. Однако EVP4593 не способен блокировать ИКК (неопубликованные данные). Предполагается, что для активации сигнального пути NF-κB необходим депо-зависимый вход кальция [10, 11]. Соответственно, выдвинуто предположение, что EVP4593 может воздействовать на этот вход и влиять таким образом на сигнальный путь NF-κB.

В ходе экспериментов мы обнаружили, что EVP4593 действительно способен эффективно уменьшать аномальный кальциевый ответ в клетках Htt138Q (рис. 2а–в). Таким образом, наиболее интересными задачами, которые планируется решить в будущем, становятся идентификация белков, ответственных за аномальный депо-зависимый вход в клетки Htt138Q, а также выявление молекулярной мишени EVP 4593.

В качестве кандидата на роль такой молекулярной мишени был предложен каналобразующий белок TRPC1. Молекулярные структуры каналов, ответственных за депо-зависимый кальци-

евый вход, относительно слабо изучены в нервных клетках, однако в качестве потенциальных участников этого входа выделяют белки семейства TRPC и Orail [25–27]. Для каналов, образованных Orail, характерны высокий потенциал реверсии и входящее выпрямление, в то время как каналы TRPC обычно относительно неселективны [12]. Учитывая полученные вольт-амперные характеристики (рис. 1б), мы решили обратить особое внимание на белок TRPC1. Ранее обсуждалась потенциальная значимость белков семейства TRPC в таких нейродегенеративных заболеваниях, как болезни Альцгеймера и Паркинсона [28, 29]. В частности, показано участие TRPC1-каналов в эксайтотоксической гибели нейронов гиппокампа [30].

Проведенные нами эксперименты показали, что TRPC1-содержащие каналы опосредуют депо-зависимый ответ в клетках Htt138Q. При супрессии TRPC1 наблюдали значительное снижение амплитуды токов в клетках Htt138Q, причем действие EVP4593 становилось менее выраженным (рис. 3б, в). Эти данные позволили предположить, что именно TRPC1 является молекулярной мишенью для EVP4593. С целью проверки данного предположения мы гиперэкспрессировали белок TRPC1 мыши в контрольных клетках SK-N-SH.

Амплитуды тапсигаргин-индуцированных токов в клетках Htt138Q и в контрольных клетках с гиперэкспрессией TRPC1 при потенциале –80 мВ сходны (рис. 3г), однако обнаружены значительные отличия в вольт-амперных характеристиках (рис. 3д, е). Оказалось, что экспрессия TRPC1 в клетках Htt138Q не увеличивается (рис. 3а). Кроме того, в условиях гиперэкспрессии TRPC1 в контрольных клетках EVP4593 не оказывал никакого влияния на депо-зависимый кальциевый вход (рис. 3е) в отличие от его действия на тапсигаргин-индуцируемые токи в клетках Htt138Q (рис. 2а). На основе полученных данных сделан вывод, что EVP4593 действует на гетеромерные каналы, содержащие субъединицу TRPC1, но не на гомоолигомерные каналы, состоящие исключительно из TRPC1.

Таким образом, несмотря на то что аномальный депо-зависимый ответ в клетках Htt138Q опосредуется каналами, содержащими TRPC1, сам белок TRPC1 не служит непосредственной молекулярной мишенью для EVP4593. Дальнейшая работа должна быть направлена на идентификацию белков, участвующих в усилении депо-зависимого ответа в клетках Htt138Q, и белка/ов – молекулярных мишеней для EVP4593.

Мы выражаем благодарность компании EnVivo Inc. (США) за любезно предоставленные соединения EVP, Dr. L. Tsiokas (University of Oklahoma Health Science Center) за любезно предостав-

ленную плазмиду с siRNA против TRPC1, Dr. S. Muallem (НИН, США) за любезно предоставленную конструкцию для гиперэкспрессии TRPC1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (ГК П332, ГК 14.740.11.0924), программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, грантов РФФИ (11–04–12047, 10–04–01002, 10–04–00956), НШ-3796.2010.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vonsattel J.P., Myers R.H., Stevens T.J., Ferrante R.J., Bird E.D., Richardson E.P. Jr. 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.* **44**(6), 559–577.
- Tang T-Sh., Tu H., Chan Edmond Y.W., Maximov A., Wang Zh., Wellington Cheryl L., Hayden M.R., Bezprozvanny I. 2003. Huntingtin and Huntingtin-associated protein 1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5) trisphosphate receptor type 1. *Neuron.* **39**(2), 227–239.
- Tang T-Sh., Chen X., Liu J., Bezprozvanny I. 2007. Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J. Neurosci.* **27**(30), 7899–7910.
- Panov A.V., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., Hayden M.R., Burke J.R., Strittmatter W.J., Greenamyre J.T. 2002. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* **5**(8), 731–736.
- Choo Y.S., Johnson G.V., MacDonald M., Detloff P.J., Lesort M. 2004. Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome *c* release. *Hum. Mol. Genet.* **13**(14), 1407–1420.
- Bouron A., Altafaj X., Boisseau S., De Waard M. 2005. A store-operated Ca²⁺ influx activated in response to the depletion of thapsigargin-sensitive Ca²⁺ stores is developmentally regulated in embryonic cortical neurons from mice. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **159**(1), 64–71.
- Tobe M., Isobe Y., Tomizawa H., Nagasaki T., Takahashi H., Fukazawa T., Hayashi H. 2003. Discovery of quinazolines as a novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation. *Bioorg. Med. Chem.* **11**(3), 383–391.
- Tobe M., Isobe Y., Tomizawa H., Nagasaki T., Takahashi H., Hayashi H. 2003. A novel structural class of potent inhibitors of NF-kappa B activation: structure-activity relationships and biological effects of 6-aminoquinazoline derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **11**(18), 3869–3878.
- Hamill O.P., Sakmann B. 1981. Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature.* **294**(5840), 462–464.
- Okamura H., Rao A. 2001. Transcriptional regulation in lymphocytes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**(2), 239–243.
- Stankunas K., Graef I.A., Neilson J.R., Park S.H., Crabtree G.R. 1999. Signaling through calcium, calcineurin, and NF-AT in lymphocyte activation development. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **64**, 505–516.
- Clapham D.E. 2002. Sorting out MIC, TRP and CRAC ion channels. *J. Gen. Physiol.* **120**(2), 217–220.
- Wu X., Babnigg G., Villereal M.L. 2000. Functional significance of human trp1 and trp3 in store-operated Ca²⁺ entry in HEK-293 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **278**(3), 526–536.
- Ambudkar I.S., Ong H.L., Liu X., Bandyopadhyay B., Cheng K. T. 2007. TRPC1: The link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium.* **42**(2), 213–223.
- Salido G.M., Sage S.O., Rosado J.A. 2009. TRPC channels and store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem. Biophys. Acta.* **1793**(2), 223–230.
- Riccio A., Medhurst A.D., Mattei C., Kelsell R.E., Calver A.R., Randall A.D., Benham C.D., Pangalos M.N. 2002. mRNA distribution analysis of human TRPC family in CNS and peripheral tissues. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **109**(1–2), 95–104.
- Zeron M.M., Hansson O., Chen N., Wellington C.L., Leavitt B.R., Brundin P., Hayden M.R., Raymond L.A. 2002. Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron.* **33**(6), 849–860.
- Fan M.M., Fernandes H.B., Zhang L.Y., Hayden M.R., Raymond L.A. 2007. Altered NMDA receptor trafficking in a yeast artificial chromosome transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* **27**(14), 3768–3779.
- Zhang H., Li Q., Graham R.K., Slow E., Hayden M.R., Bezprozvanny I. 2008. Full length mutant huntingtin is required for altered Ca²⁺ signaling and apoptosis of striatal neurons in the YAC mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* **31**(1), 80–88.
- Глушанкова Л.Н., Зимина О.А., Вигонт В.А., Можаяева Г.Н., Безпрозванный И.Б., Казначеева Е.В. 2010. Изменение депо-управляемого входа кальция в клеточной модели болезни Хантингтона. *ДАН.* **433**(6), 1–4.
- Khoshnan A., Ko J., Watkin E.E., Paige L.A., Reinhart P.H., Patterson P.H. 2004. Activation of the Ikap-paB kinase complex and nuclear factor-kappaB contributes to mutant huntingtin neurotoxicity. *J. Neurosci.* **24**(37), 7999–8008.
- Qin Z.H., Wang Y., Nakai M., Chase T.N. 1998. Nuclear factor-kappa B contributes to excitotoxin-induced apoptosis in rat striatum. *Mol. Pharmacol.* **53**(1), 33–42.
- Nakai M., Qin Z.H., Chen J.F., Wang Y., Chase T.N. 2000. Kainic acid-induced apoptosis in rat striatum is associated with nuclear factor-kappaB activation. *J. Neurochem.* **74**(2), 647–658.
- Qin Z.H., Wang Y., Chen R.W., Wang X., Ren M., Chuang D.M., Chase T.N. 2001. Prostaglandin A(1) protects striatal neurons against excitotoxic injury in rat striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**(1), 78–87.
- Berna-Erro A., Braun A., Kraft R., Kleinschnitz C., Schuhmann M.K., Stegner D., Wultsch T., Eilers J., Meuth S.G., Stoll G., Nieswandt B. 2009. STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Sci. Signal.* **2**(93), ra67.

26. Hasan G., Venkiteswaran G. 2010. The enigma of store-operated Ca-entry in neurons: answers from the *Drosophila* flight circuit. *Front. Neural. Circuits.* **4**, 10.
27. Gruszczynska-Biegala J., Pomorski P., Wisniewska M.B., Kuznicki J. 2011. Differential roles for STIM1 and STIM2 in store-operated calcium entry in rat neurons. *PLOS One.* **6**(4), e19285.
28. Yamamoto S., Wajima T., Hara Y., Nishida M., Mori Y. 2007. Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1772**(8), 958–967.
29. Selvaraj S., Sun Y., Singh B.B. 2010. TRPC channels and their implication in neurological diseases. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* **9**(1), 94–104.
30. Narayanan K.L., Irmady K., Subramaniam S., Unsicker K., von Bohlen und Halbach O. 2008. Evidence that TRPC1 is involved in hippocampal glutamate-induced cell death. *Neurosci. Lett.* **446**(2–3), 117–122.

Store-Operated Calcium Entry into SK-N-SH Human Neuroblastoma Cells Modeling Huntington's Disease

V. A. Vigont, O. A. Zimina, L. N. Glushankova, I. B. Bezprozvanny,
G. N. Mozhaeva, E. V. Kaznacheeva

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretsky prosp., 4, St. Petersburg 194064, Russia;
email: evkazn@mail.cytspb.rssi.ru

Department of Physiology, UT Southwestern Medical Center at Dallas, TX 75390, USA

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disorder caused by expansion of polyglutamine on the N-terminus of the huntingtin protein. Striatal medium spiny (MSN) neurons are the primary targets of HD pathology. In our study, a cellular model of HD was based on the human neuroblastoma cells SK-N-SH transfected with plasmid for expression of the mutant huntingtin protein Htt138Q. Expression of Htt138Q increased store-dependent calcium entry into SK-N-SH cells. EVP4593 reversibly blocked the anomalous store-dependent response, probably generated by the channels incorporating TRPC1 (short transient receptor potential channel 1) subunit.