

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

СУЛЬДИНА ЛЮБОВЬ АЛЕКСАНДРОВНА

**Особенности ультраструктурной организации клеток
человека с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*,
полученных от пациентов с болезнью Хантингтона или в
результате генетической модификации**

1.5.22. – клеточная биология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Киселева Е. В.

Новосибирск, 2023

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1. Особенности патогенеза болезни Хантингтона	17
1.2. Структурно-функциональная организация нейронов.....	21
1.2.1. Нарушение структуры нейронов при нейродегенеративных заболеваниях ...	24
1.3. Подходы и методы, используемые для изучения механизмов развития нейродегенеративных заболеваний	30
Заключение.....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	38
2.1. Характеристика клеточных культур, использованных в работе	38
2.1.1. Культуры нейронов пациент-специфичной клеточной модели болезни Хантингтона	38
2.1.2. Культуры генетически модифицированных нейронов клеточной модели болезни Хантингтона	39
2.1.3. Линии клеток НЕК293 со встройкой большого количества CAG повторов в ген <i>HTT</i>	41
2.2. Фиксация и заключение образцов для электронной микроскопии	41
2.3. Получение и окрашивание полутонких и ультратонких срезов.....	42
2.4. Морфометрический анализ.....	42
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	44
3.1. Ультраструктура пациент-специфичных нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене <i>HTT</i>	44

3.1.1. Электронно-микроскопический анализ морфологии нейронов, дифференцированных из здоровых клеток и клеток пациентов с болезнью Хантингтона	44
3.1.2. Морфометрический анализ количества митохондрий и аутолизосом в пациент-специфичных нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене <i>HTT</i>	56
3.1.3. Исследование влияния ингибитора кальциевых каналов EVP4593 на морфологию пациент-специфичных нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене <i>HTT</i>	56
3.2. Исследование ультраструктурной организации генетически модифицированных нейронов с увеличенным до 69 числом CAG повторов в гене <i>HTT</i>	62
3.2.2. Ультраструктурная организация контрольных и генетически модифицированных нейронов с 69 CAG повторами в гене <i>HTT</i>	62
3.2.3. Морфометрический анализ количественных параметров клеточных структур с нарушенной организацией в генетически модифицированных нейронах с 69 CAG повторами в гене <i>HTT</i>	78
3.3. Исследование ультраструктурной организации клеток НЕК293 с увеличенным числом (100-150) CAG повторов в гене <i>HTT</i>	83
3.3.1. Сравнение ультраструктурной организации исходных и генетически модифицированных клеток линии НЕК293 Phoenix, несущих 100-150 CAG повторов в гене <i>HTT</i>	83

3.3.2. Сравнение ультраструктурной организации исходных и генетически модифицированных клеток линии НЕК293 FT, несущих 100-150 CAG повторов в гене <i>HTT</i>	91
3.3.3. Морфометрический анализ количества митохондрий и аутолизосом в клетках клонов НЕК293 со 100-150 CAG повторами в гене <i>HTT</i>	100
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	102
4.1. Сходство морфологических дефектов в мутантных клетках с увеличенным числом CAG повторов в гене <i>HTT</i>	102
4.1.1. Особенности негативного влияния повышенного числа CAG повторов на структурную организацию шероховатого и гладкого ЭПР	103
4.1.2. Возможные причины роста числа дефектных митохондрий в нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене <i>HTT</i>	106
4.1.3. Возможные причины нарушения аутофагии в мутантных нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене <i>HTT</i>	109
4.1.4. Уменьшения числа шипиков на дендритах пациент-специфичных нейронов может быть связано с нарушением гомеостаза кальция	113
4.1.5. Возможная роль ингибитора кальциевых каналов EVR4593 в улучшении морфологии митохондрий и аутолизосом в пациент-специфичных нейронах.....	114
4.2. Увеличение числа CAG повторов в гене <i>HTT</i> и усиление проявления ультраструктурных нарушений в генетически модифицированных нейронах и клетках НЕК293	115
4.2.1. Связь увеличения до 69 числа CAG повторов в гене <i>HTT</i> в генетически модифицированных нейронах с появлением нарушений структурной организации дендритов, шипиков и синапсов	116

4.2.2. Возможные причины атипичного слипания мембран шероховатого ЭПР в мутантных клетках НЕК293 при увеличении числа СAG повторов до 100-150 в гене <i>HTT</i>	118
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	123
ВЫВОДЫ	125
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	126

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – аппарат Гольджи

АФК – активные формы кислорода

БА – болезнь Альцгеймера

БАС – боковой амиотрофический склероз

БП – болезнь Паркинсона

БХ – болезнь Хантингтона

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ДАГ – диацилглицерол

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

МММ – митохондриально-ассоциированные мембраны

ПМЛ – пермеабилитация мембран лизосом

СШН – средние шипиковые нейроны

ЦНС – центральная нервная система

ЭСК – эмбриональные стволовые клетки

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

BDNF – brain-derived neurotrophic factor (нейротрофический фактор мозга)

GDNF – Glial cell line-derived neurotrophic factor (глиальный нейротрофический фактор)

GFP – green fluorescent protein (зелёный флуоресцентный белок)

HEK293 – Human Embryonic Kidney 293, клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека

HTT – ген, кодирующий белок хантингтин

Htt – хантингтин

mHtt – мутантный хантингтин

polyQ – полиглутаминовый тракт

SOCE – store operated calcium entry (депо-управляемый транспорт кальция)

CAG – триплет (цитозин-аденин-гуанин), кодирующий аминокислоту глутамин

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Одной из актуальных задач современной нейробиологии является изучение механизмов нейродегенеративных заболеваний. Болезнь Хантингтона (также называемая хореей или синдромом Гентингтона) это генетическое заболевание, обусловленное гибелью нейронов стриатума, которое вызывается увеличением числа кодонов CAG, кодирующих аминокислоту глутамин, в первом экзоне гена *huntingtin* (*HTT*). В результате формируется мутантный белок хантингтин (mHtt) с нарушенной третичной структурой и способностью к агрегации (Folger, Wang, 2021). Нормальным количеством повторов в гене считается 10-35, при числе от 36 до 39 синдром имеет неполную пенетрантность, при более чем 40 повторах вероятность развития болезни близка к 100%, при этом с увеличением числа повторов заболевание развивается в более раннем возрасте (DiTella et al., 2022). Синдром наследуется по аутосомно-доминантному типу. В настоящее время активно ведется разработка методов терапии, способной остановить или замедлить развитие болезни, так, например, перспективным направлением считается применение антисмысловых олигонуклеотидов, блокирующих мутантную РНК (Rook, Southwell, 2022), а также вещества, способного связываться с CAG повторами и сокращать их число (Nakamori et al., 2020). Для лечения людей эти методы пока недоступны, они находятся ещё на стадии разработки, поэтому пациентам проводят терапию, направленную на уменьшение симптомов (Kim et al., 2021).

Роль белка хантингтина (Htt) в клетке все еще не до конца ясна, однако известно, что, взаимодействуя со множеством других белков, Htt участвует в везикулярном транспорте, синаптической передаче, влияет на апоптоз и регуляцию транскрипции генов в нервных клетках (Sap et al., 2021). Удлинение полиглутаминового тракта приводит к агрегации молекул mHtt

между собой и другими белками, в результате чего формируются внутриклеточные агрегаты (Landles et al., 2020). Роль этих агрегатов в развитии болезни не до конца установлена. Некоторые исследователи считают, что эти включения, встречающиеся как в цитоплазме, так и в ядрах, нарушают нормальное функционирование клетки. Другие, напротив, полагают, что агрегаты снижают токсический эффект mHtt (Zuccato et al., 2010). К настоящему времени ряд работ указывает на нарушение функционирования различных процессов в клетке при мутации в гене *HTT*. Так среди ключевых процессов, вносящих вклад в развитие патогенеза болезни Хантингтона, предполагают дисфункцию везикулярного транспорта, и как следствие, синаптической передачи (Ravalia et al., 2021); нарушение синтеза белка и стресс ЭПР (Kim et al., 2022); ухудшение функционирования митохондрий и окислительный стресс (Okada et al., 2021); нарушению гомеостаза кальция в клетке (Kraskovskaya, Bezprozvanny, 2021).

Ранее исследование механизмов развития патологии на клеточном уровне были затруднены ограниченной доступностью материала для изучения, в распоряжении исследователей был постмортальный материал, который не давал возможность проследить патогенез в динамике. В настоящее время активно идёт разработка адекватных моделей болезни Хантингтона, которые позволяют выяснить, нарушение каких именно внутриклеточных процессов приводит к гибели нейронов и развитию патологии, что поможет разработать стратегии лечения этого заболевания (Csobonyeiova et al., 2020). На данный момент создан ряд линий лабораторных животных, моделирующих данную патологию, однако животные модели не воссоздают все аспекты заболевания (Mattis, Svendsen, 2017). Наиболее перспективным объектом для изучения болезни Хантингтона являются клеточные культуры, несущие увеличенное число CAG повторов в гене *HTT*, поскольку они воссоздают характерное для человека развитие патологии, снабжают исследователей необходимым объемом материала и доступны для экспериментальных воздействий. Один

из подходов создания таких моделей является получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из соматических клеток больных пациентов и их дальнейшая дифференцировка в средние шипиковые нейроны стриатума. Такие пациент-специфичные клетки позволяют анализировать схожие мутации на различном генетическом фоне и могут применяться для разработки стратегии лечения конкретного пациента в контексте пресонализированной медицины (Monk, Connor, 2021). Ещё одним способом разработки клеточных моделей является внесение мутации в геном лабораторных линий клеток человека с помощью систем геномного редактирования. Полученные в результате генетически модифицированные модельные линии клеток человека позволяют получить генетически идентичные (изогенные) клоны, отличающиеся только изменением в целевом гене (Qin et al., 2022). Такие линии являются экспериментальной системой с очень хорошим контролем, где каждое фенотипическое различие с большей вероятностью обусловлено нарушениями, вызванными внесенной мутацией. Наравне с молекулярно-биологическими и нейрофизиологическими методами изучения нарушений в организации клеток в составе клеточных моделей, имитирующих нейродегенеративные заболевания, ультраструктурный анализ клеток дает много новой информации о развитии патологического процесса на уровне клеточных структур. Высокорастворимая электронная микроскопия позволяет не только охарактеризовать патологический фенотип, то есть оценить соответствие клеточной модели исследуемому заболеванию, но и выявить ранее не наблюдавшиеся нарушения структуры органелл при мутации гена и, в комбинации с морфометрическим анализом параметров клетки и ее органелл, оценить влияние лекарственных кандидатов.

Цели и задачи исследования

Целью настоящего исследования является выявление и изучение последствий увеличения числа CAG повторов в гене *HTT*, кодирующем

белок хантингтин, в ультраструктурной организацию клеток и цитоплазматических органелл с использованием различных клеточных моделей болезни Хантингтона.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Исследовать и сравнить ультраструктурную организацию цитоплазматических органелл, включая ЭПР, митохондрии и аутолизосомы, в двух клеточных моделях болезни Хантингтона: пациент-специфичных (42-47 CAG повторов в гене *HTT*) и генетически модифицированных (69 CAG повторов в гене *HTT*) культур нейронов.

2. Провести сравнительный анализ влияния увеличения числа CAG повторов в гене *HTT* на организацию структур, отвечающих за передачу нервного сигнала: дендритов, шипиков и синапсов, в культурах пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронов (42-47, и 69, соответственно).

3. Исследовать особенности ультраструктуры органелл в генетически модифицированных клетках НЕК293 с большим числом CAG повторов (100-150) в гене *HTT*.

4. Оценить влияние ингибитора кальциевых каналов EVP4593 на ультраструктуру органелл пациент-специфичных нейронов с 47 CAG повторами в гене *HTT*.

Научная новизна работы

В настоящей работе впервые проведен сравнительный анализ и охарактеризованы нарушения органелл в различных клеточных культурах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*: культурах пациент-специфичных нейронов (42-47 CAG повтора); нейрональных культурах генетически модифицированных клеток (69 CAG повторов) и генетически модифицированных клеточных линиях НЕК293 (100-150 CAG повторов). Показано, что все перечисленные культуры характеризуются схожими

дефектами морфологии 3-х групп органелл: шероховатого и гладкого ЭПР (везикуляция мембран); митохондрий (дефекты оболочек, крист и матрикса) и аутолизосом (нарушение целостности мембраны). Продемонстрирована корреляция между увеличением до 69 числа CAG повторов в гене *HTT* в генетически модифицированных нейронах и появлением нарушений в организации синапсов, дендритов и шипиков, а также ростом числа гибнущих клеток. Впервые в цитоплазме генетически модифицированных клеток НЕК293 со 100-150 повторами в гене *HTT* выявлены 4-х-слойные мембраны, сформировавшиеся в результате взаимного слияния двух цистерн ЭПР. Высказано предположение, что причиной этого может служить нарушение состава фосфолипидных мембран. Впервые показано, что ингибитор депо-зависимых кальциевых каналов EVP4593 снижает количество дефектных митохондрий и аутолизосом в цитоплазме пациент-специфичных нейронов с увеличенным числом CAG повторов.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в работе данные имеют как фундаментальное, так и прикладное значение в области изучения особенностей развития клеточных дефектов при болезни Хантингтона и поиска подходов для замедления ее развития. Впервые установлено, что клетки с разным числом CAG повторов в гене *HTT* характеризуются существенными нарушениями митохондрий, мембран ЭПР и аутолизосом. Увеличение числа CAG повторов в гене *HTT* до 69 вызывает не только дефекты в органеллах нейронов, но и нарушение организации дендритов, шипиков и синапсов - структур, отвечающих за передачу нервного импульса. Увеличение числа CAG повторов в гене *HTT* до 100-150 в генетически модифицированных клетках НЕК293 сопровождается появлением в цитоплазме атипично слипшихся мембран ЭПР. Впервые продемонстрировано, что ингибиторирование депо-зависимых кальциевых каналов с помощью EVP4593 положительно сказывается на морфологии клеток в пациент-специфичных нейрональных культурах с 47 CAG

повторами в гене *HTT*, а именно снижает число дефектных митохондрий и аутолизосом.

Положения, выносимые на защиту:

1. В пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* выраженность нарушений структурной организации цитоплазматических органелл – шероховатого и гладкого ЭПР, митохондрий и аутолизосом, а также структур, отвечающих за передачу нервного сигнала – дендритов, шипиков и синапсов, зависит от числа этих повторов.

2. Увеличение числа CAG повторов в гене *HTT* до 100-150 в генетически модифицированных клетках HEK293 приводит к нарушениям в строении мембран ЭПР, митохондрий и аутолизосом, вплоть до появления в цитоплазме атипично слипшихся мембран ЭПР, формирующих четырёхслойные структуры.

3. Ингибитор депо-зависимых кальциевых каналов EYP4593 оказывает положительное влияние на морфологию пациент-специфичных нейронов с 47 CAG повторами, снижая число дефектных митохондрий и аутолизосом.

Вклад автора

Весь экспериментальный материал был изучен в просвечивающем электронном микроскопе, проанализирован и оценен с помощью морфометрического анализа автором самостоятельно.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на следующих научных конференциях:

1. Suldina L.A., Morozova K.N., Malankhanova T.B., Kiseleva E. An increase in the number of CAG repeats in the huntingtin gene enhances pathological ultrastructural aberrations in the cells and neurons (BIOINFORMATICS OF GENOME

REGULATION AND STRUCTURE/SYSTEMS BIOLOGY (BGRS/SB-2022)
Novosibirsk, 04–08 июля 2022 года.

2. Сульдина Л.А., Морозова К.Н., Маланханова Т.Б., Киселева Е.В. Атипичные нейроны с высокой плотностью расположения дефектных шипиков в популяции нейронов с 69 CAG повторами в гене хантингтина. (XXIX Российская конференция по электронной микроскопии), Россия, 2022.

3. Suldina L.A., Morozova K.N., Malankhanova T.B., Malakhova A.A., Kiseleva E. Electron microscopy analysis of autophagy in neurons with expanded CAG repeats in the huntingtin gene investigated at patient-specific and transgenic models // (MOLECULAR MECHANISMS OF AUTOPHAGY IN DISEASES, Санкт-Петербург, Россия, 2020).

4. Малахова А.А., Маланханова Т.Б., Григорьева Е.В., Сульдина Л.А., Морозова К.Н., Киселева Е.В., Закиян С.М. Моделирование и изучение механизмов развития болезни хантингтона на линиях плюрипотентных стволовых клеток человека (Международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы», Новосибирск, Россия, 2019).

5. Маланханова Т.Б., Григорьева Е.В., Сульдина Л.А., Морозова К.Н., Киселева Е.В., Закиян С.М., Малахова А.А. Исследование мутантного фенотипа изогенной клеточной модели болезни Хантингтона. (VI Национальный конгресс по регенеративной медицине, Москва, Россия, 2019).

6. Morozova K.N., Suldina L.A., Malankhanova T.B., Grigor'eva E.V., Zakian S.M., Kiseleva E., Malakhova A.A. Ultrastructural defects in isogenic lines of human cells with expanded CAG repeats in the huntingtin gene obtained via the CRISPR/Cas9 technology (International congress Crispr-Гены и клетки. 2, С.77, Novosibirsk, Россия, 2018).

7. Григорьева Е.В., Сурумбаева А., Маланханова Т.Б., Павлова С.В., Сульдина Л.А., Закиян С.М. Дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в нейроны стриатума для создания модели in vitro болезни Хантингтона. Международная конференция «Беляевские чтения», посвященная 100-летию со дня рождения академика АН СССР Д.К. Беляева, сборник тезисов, С. 99, Новосибирск, Россия, 2017).

8. Морозова К.Н., Сульдина Л.А., Маланханова Т.Б., Малахова А.А., Закиян С.М., Киселева Е.В. Электронно-микроскопический анализ ультраструктурной реорганизации клеток с делециями и встройками в ген хантингтина. Международная конференция «Беляевские чтения», посвященная 100-летию академика АН СССР Д.К. Беляева, сборник тезисов, С. 106, Новосибирск, Россия 2018).

9. Сульдина Л.А., Некрасов Е.Д., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Киселева Е.В. Ультраструктурная организация нейронов, дифференцированных из эмбриональных стволовых и индуцированных плюрипотентных клеток здоровых и больных хореей Хантингтона пациентов. (XXVI Российская конференция по электронной микроскопии, сборник тезисов С.740, Зеленоград, Россия 2016).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликованы следующие статьи в рецензируемых журналах:

1. Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., Lebedeva O.S., Vasina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Kostriukova E.S., Kiseleva E., Suldina L.A., Zimina O.A., Ryazantseva M.A., Skopin A.Yu., Illarioshkin S.N., Kaznacheeva E.V., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons // *Molecular Neurodegeneration* – 2016. – Vol. 11. - № 1. – P. 1-15.

2. Suldina L.A., Morozova K.N., Malankhanova T.B., Grigor'eva E.V., Zakian S.M., Kiseleva E., Malakhova A.A. Introducing an expanded CAG tract into the huntingtin gene causes a wide spectrum of ultrastructural defects in cultured human cells // *PLOS ONE*. – 2018. – Vol. 13. – № 10. – P. e0204735

3. Morozova K.N., Suldina L.A., Malankhanova T.B., Grigor'eva E.V., Zakian S.M., Kiseleva E., Malakhova A.A. Ultrastructural defects in isogenic lines of human cells with expanded CAG repeats in the huntingtin gene obtained via the CRISPR/Cas9 technology // *Genes and Cells*. – 2018. – Vol. 2. – № 77.

4. Malankhanova T., Suldina L., Grigor'eva E., Medvedev S., Minina J., Morozova K., Kiseleva E., Zakiyan S., Malakhova A. Human induced pluripotent stem cell-derived isogenic model of Huntington's disease based on neuronal cells has several relevant phenotypic abnormalities // *Journal of Personalized Medicine*. – 2020. – Vol. 10. – № 4. – P. 215.

5. Grigor'eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A., Pavlova S.V., Minina J.M., Kizilova E.A., Suldina L.A., Morozova K.N., Kiseleva E., Sorokoumov E.D., Lebedev I.N., Malakhova A.A., Zakian S.M. Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells // *Cytotechnology*. – 2020. – Vol. 72. – P. 649-663.

6. Suldina L.A., Morozova K.N., Malankhanova T.B., Malakhova A.A., Kiseleva, E.. Electron microscopic analysis of autophagy in neurons with expanded CAG repeats in the huntingtin gene in patient-specific and transgenic cell model. *Cell Death Discovery*. - 2021. – Vol. 7. – P. 1–14.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 155 страницах, содержит 36 рисунков и 2 таблицы. Библиографический указатель литературы содержит 278 ссылок на статьи, из которых одна российская и 277 зарубежных.

Благодарности

Автор благодарен всем принимавшим участие в получении и обсуждении результатов настоящей работы. Особую благодарность автор выражает сотрудникам лаборатории генетических основ клеточных технологий института общей генетики им. Н. И. Вавилова Некрасову Е.Д., Лагарьковой М.А., Киселеву С.Л., а также Маланхановой Т.Б., Григорьевой Е.В. и Малаховой А.А. сотрудникам лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН за предоставленные клеточные культуры. Работа была выполнена на

оборудовании ЦКП микроскопического анализа биологических объектов, и автор выражает благодарность его сотрудникам за техническую помощь.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Особенности патогенеза болезни Хантингтона

Болезнь Хантингтона (БХ) наследственное нейродегенеративное заболевание, вызываемое увеличением количества CAG повторов в первом экзоне гена *HTT*. Кодон CAG кодирует аминокислоту глутамин, а последовательность из нескольких звеньев глутамина представляет собой так называемый полиглутаминовый тракт (polyQ). Характерными проявлениями заболевания являются прогрессирующие непроизвольные хореические движения, поведенческие и психические расстройства, а также деменция (Tabrizi et al., 2020). БХ является одним из более 40 заболеваний, которые вызываются экспансией простых повторов, и самым распространенным из девяти, связанных с удлинением именно polyQ (Paulson, 2018). БХ распространена во всем мире и имеет частоту встречаемости в среднем около 6 на 100000 человек в популяциях европейского происхождения (Medina et al., 2022). Возраст появления первых симптомов варьирует от раннего детства до глубокой старости и обратно пропорционален числу повторов в гене, в среднем составляет около 40 лет (Kwa et al., 2020).

При БХ в первую очередь погибают нейроны стриатума, а на поздних стадиях болезни - коры головного мозга. Около 95% клеток стриатума составляют шипиковые нейроны среднего размера (СШН) (Chuhma et al., 2023). Остальные 5% нейронов представлены бесшипиковыми вставочными нейронами (интернейронами), которые морфологически отличаются крупными размерами и разветвленными дендритами (Porri et al., 2021). При БХ дегенерации подвергаются СШН, тогда как интернейроны обычно не затрагиваются патологией (delRey, García-Cabezas, 2023). Предполагается, что в основе подобного типа дегенерации полосатого тела при БХ может лежать избирательная чувствительность популяций нейронов полосатого тела к возбуждающим нейротрансмиттерам и нейротрофическим факторам (Bergonzoni et al., 2021). Дифференциальное распределение глутаматных

рецепторов и субъединиц в стриарных нейронах может определять чувствительность их популяции к эксайтотоксическим сигналам (сверхактивации ионотропных рецепторов глутамата в ответ на эндогенные или экзогенные возбуждающие нейротрансмиттеры) (Coyle, Schwarcz, 1976; Cicchetti et al., 2011; Rikani et al., 2014). В то же время нейротрофические факторы избирательно защищают определенные популяции нейронов от эксайтотоксических повреждений. Так например, было показано, что нейротрофические факторы BDNF и NT-3 одинаково защищали стриарные нейроны, экспрессирующие ГАМК/энкефалин и ГАМК/такикинин, в то время как нейротрофические факторы GDNF и нейтуриновые факторы избирательно защищали либо первые либо вторые (Alberch, 1999; Pérez-Navarro et al., 1999). Таким образом, избирательная гибель именно СШН может быть обусловлена дисфункциональностью нейротрофической системы, которая селективно должна защищать данный конкретный тип нейронов (Rikani et al., 2014).

Htt представляет собой большой, повсеместно экспрессирующийся белок, содержащий как сигналы ядерного экспорта, так и сигналы ядерной локализации, поэтому белок перемещается между ядром и цитоплазмой с помощью активного транспорта (Bessert et al. 1995; Xia et al. 2003; Zheng et al. 2013). Htt участвует в развитии ЦНС, включая формирование нервной трубки и миграцию нейробластов, показано, что мыши с нокаутом Htt умирают до рождения, вскоре после образования нервной системы (Nasir et al., 1995; Zeitlin et al., 1995). Htt также участвует в аксональном транспорте, синаптической функции (Migazzi et al., 2021). Мутантный белок mHtt, возникающий в результате увеличения количества CAG повторов в гене *HTT*, негативно влияет на многие клеточные функции, приводя в конечном итоге к гибели клеток. Определение того, какие из этих эффектов являются первичными или вторичными патогенетическими процессами, является сложной задачей (Tabrizi et al., 2020). Установлено, что длина полиглутаминового тракта влияет на посттрансляционную модификацию Htt,

которая, в свою очередь, может оказывать действие на внутриклеточное распределение, стабильность, расщепление и функцию белка (Ehrnhoefer et al., 2011). Увеличение polyQ вызывает аномальное свертывание mHtt, в результате чего растворимые мономеры белка Htt накапливаются с образованием олигомеров. Эти олигомеры затем действуют как затравки для образования фибрилл и крупных агрегатов mHtt в цитоплазме и в ядре (DiFiglia et al., 1997; Cooper et al., 1998; Hoffher et al., 2005). Включения агрегатов mHtt ранее считались патогенными (Ross, 1997; Davies et al., 1998), однако, позднее было показано, что их присутствие не всегда приводит к гибели клетки (Saudou et al., 1998; Arrasate et al., 2004; Slow et al., 2005).

Патогенным количеством считается 36 CAG повторов в гене *HTT*, однако до 39 CAG повторов болезнь Хантингтона имеет сниженную пенетрантность (Ozoemena et al., 2023), то есть люди, несущие эти аллели с небольшим числом избыточных повторов могут не иметь симптомов БХ до конца своей жизни. При этом, чем выше количество CAG повторов, тем в более раннем возрасте заболевание манифестирует (Schultz et al., 2020; Langbehn, 2022). Проявление первых симптомов у пациента в возрасте до 21 года наблюдается у 4-10% из всех случаев БХ (Quarrell et al., 2019; Sprenger et al., 2019) и примерно в 50% этих случаев количество CAG повторов в гене более 60, а наличие более 80 CAG повторов в гене приводит к проявлению симптомов заболевания в детстве (Bessert et al., 1995; Fusilli et al., 2018; Bakels, 2022). Установлено, что у гомозиготных пациентов с увеличенным числом повторов в гене *HTT* возраст проявления заболевания такой же, как у гетерозиготных, но болезнь прогрессирует сильнее (Grimm et al., 2021).

Показано, что CAG повторы в гене *HTT* соматически и мейотически неустойчивы, прогрессивно удлиняются на протяжении всей жизни и имеют тенденцию к увеличению между поколениями (Monckton, 2021; Cho et al., 2022). При исследовании образцов крови и постмортальных образцов коры мозга пациентов с БХ было показано, что большее удлинение CAG коррелирует с более ранним возрастом начала заболевания (Swami et al.,

2009; Lee et al., 2019). Это указывает на то, что соматическая нестабильность повтора CAG играет важную роль в патогенезе.

Было установлено, что степень соматической нестабильности CAG повторов различается в разных тканях. При исследовании посмертных образцов в СШН было определено до 1000 CAG повторов в гене *HTT* (Kennedy et al., 2003). Показано, что в других тканях, таких как мозжечок и кровь, количество CAG повторов в гене *HTT* относительно стабильно, либо не меняется с возрастом, либо увеличивается всего на несколько CAG повторов в небольшой доле клеток (Ansved et al., 1998). В одном из исследований математическая модель, адаптированная к данным о длине повтора и фенотипу у людей с БХ, показала, что проявление моторных симптомов происходит, когда количество CAG повторов превышает 115 в достаточном количестве восприимчивых клеток (Ansved et al., 1998; Kaplan et al., 2007). В посмертных тканях головного мозга пациентов и на животных моделях БХ анатомическое распределение нестабильности соматических CAG повторов часто совпадает с областями нейропатологии. Это позволяет предположить, что удлинение CAG тракта в соматических клетках может лежать в основе избирательной уязвимости средних шипиковых нейронов полосатого тела (LaSpada, 1997).

Длина тракта повторов CAG в гене *HTT* является основным фактором, определяющим течение БХ (Wright et al., 2019) и составляет около 50–70% вариабельности в возрасте проявления заболевания (Shirasaki et al., 2012; Lee et al., 2019). Однако, до половины оставшейся вариабельности связано с наследственностью и, следовательно, является результатом вариаций в других частях генома (Wexler et al. 2004). Полногеномные анализы ассоциаций, проведенные разными группами исследователей, показали, что наибольшую роль в этой вариации играют гены системы репарации ДНК, и их генетические варианты приводят либо к более ранней манифестации и ускорению прогрессии заболевания, либо наоборот, откладывают его проявление и замедляют течение болезни (Tabrizi et al., 2020). Кроме того,

таким модификатором является структура самого CAG повтора: на самом 3' конце тракта CAG присутствует мотив CAACAG, который кодирует два дополнительных глутамина. У пациентов без этой CAA встройки, начало заболевания регистрируется в среднем на 12,7 лет раньше, чем можно было бы ожидать исходя из количества повторов, а у пациентов с дупликацией мотива CAACAG начало отложено в среднем на 5 -7 лет, несмотря на то, что дупликация увеличивает общее количество глутаминов. Потеря встройки CAA также ассоциирована с соматической экспансией CAG повторов в гене *HTT* в клетках крови и сперме (Wright et al., 2019). Высказано предположение, что встройка CAA, вероятно, препятствует соматической экспансии повторов, обусловленной функционированием системы репарации ДНК (Wright et al., 2019).

1.2. Структурно-функциональная организация нейронов

Основными функциями нервных клеток являются получение, генерация и передача нервного импульса. Для выполнения этих функций нейроны имеют 3 структурно-функциональные части: тело клетки (или сома) в котором происходит синтез белков и фосфолипидов и осуществляются все основные метаболические процессы, и два типа отростков – многочисленные ветвящиеся дендриты, собирающие входящие нервные сигналы от соседних клеток, и чаще всего один относительно гладкий аксон, который проводит нервный импульс на различные расстояния (Palay, Chan-Palay, 2011). Нервные клетки обычно содержат крупное ядро и все органеллы типичные для животных клеток. Характерными структурами нервных клеток являются тельце Ниссля, представляющее собой скопление 5-7 коротких мембран шероховатого ЭПР, а также тонкие нейрофиламенты. Цитоплазма содержит цистерны шероховатого и гладкого ЭПР, розетки из свободных рибосом, аппарат Гольджи (АГ) и митохондрии с узкими поперечно-ориентированными кристами. Митохондрии нейронов могут различаться по форме и размеру (удлиненные, палочковидные или округлые, крупные и

мелкие) в разных нейронах и даже внутри одной и той же клетки. Цитоплазма также содержит мультивезикулярные тельца, различные везикулы, лизосомы и пигментные гранулы (Palay, Chan-Palay, 2011).

Как большинство долгоживущих клеток, нейроны особенно зависимы от процесса аутофагии (Filippone et al., 2022), являющегося основным путем деградации дисфункциональных органелл и белковых агрегатов. Выделяют несколько типов аутофагии – микроаутофагию, при которой белки или небольшие структуры захватываются выростами лизосом или поздних эндосом (Abdrakhmanov et al., 2020); шаперон-зависимую аутофагию, при которой белки с помощью особого белка-шаперона доставляются в лизосому через специальный канал; и макроаутофагию, посредством которой из клетки удаляются крупные поврежденные цитоплазматические органеллы. Процесс макроаутофагии состоит из нескольких ключевых стадий: на начальном этапе вокруг структур, предназначенных для деградации, формируется незамкнутая двумембранная органелла - фагофор; затем происходит замыкание фагофора с образованием двумембранной аутофагосомы; далее происходит ее слияние с лизосомой или эндосомой, затем её внутренняя оболочка растворяется, образуется одномембранная аутолизосома (Klionsky et al., 2021). Биогенез аутофагосом происходит в дистальных отделах аксона, и лишь изредка наблюдается в дендритах и теле клетки (Sidibe et al., 2022). При движении через аксон к телу нейрона аутофагосомы встречаются и сливаются с поздними эндосомами и лизосомами, что приводит к формированию амфисом с кислым содержимым, в которых начинается деградация захваченного материала (Madau et al., 2012). Предполагается, что эти лизосомы не содержат полного набора необходимых ферментов, в отличие от лизосом в теле нейрона (Cheng et al., 2015; Gowrishankar et al., 2015). Это подтверждается экспериментами, в которых блокирование ретроградного транспорта аутофагосом нарушало их закисление и деградацию поглощенных веществ (Fu et al., 2014; Wong, Holzbaur, 2014)

Нервные клетки формируют один или несколько дендритов, в которых органеллы, включая нейрофиламенты и микротрубочки, располагаются линейно, и их число, по мере сужения дендрита, уменьшается (Palay, Chan-Palay, 2011). Шипики являются придатками дендритов, содержат микрофиламенты и небольшое количество гладкого ЭПР. Форма шипиков варьирует от тонких филоподий до коротких сидячих бугорков, либо округлых луковиц, прикрепленных к стержню дендрита через тонкий стебель (Pchitskaya, Vezprozvanny, 2020). Морфология шипика определяет стабильность, эффективность и функцию синаптических связей. Тонкие шипики менее стабильны и более пластичны (Alimohamadi et al., 2021). Размер и морфология шипика, его головки и шейки коррелируют с количеством содержащихся в нем постсинаптических рецепторов и, следовательно, с мощностью передаваемых синаптических сигналов (Yuste, Bonhoeffer, 2001). Синаптическая пластичность нейронов является следствием структурных изменений количества и формы дендритных шипиков (Ma, Zuo, 2022). Эти изменения могут происходить как в течение нескольких минут (Lendvai et al., 2000), так и длиться от недель до месяцев (Yang et al., 2009).

Нервная клетка, как правило, имеет единственный аксон, однако клетки симпатических ганглиев, клетки Гольджи в коре мозжечка имеют несколько аксонов (Palay, Chan-Palay, 2011). Аксон отходит от выпуклости тела нейрона, аксонного холмика, как гладкий прямой отросток. В его цитоплазме выявляются небольшие цистерны шероховатого ЭПР, длинные митохондрии, нейрофиламенты и микротрубочки (Palay, Chan-Palay, 2011). Основная функция аксона — это передача электрического импульса другим нейронам через синапсы, образуемые аксонными окончаниями (терминалями) и дендритами или телами другой клетки. Терминали характеризуются присутствием скоплений митохондрий, расположенных вдали от синаптической поверхности (Palay, Chan-Palay, 2011), а также синаптических пузырьков диаметром 20-60 нм, концентрирующихся вблизи

пресинаптической мембраны (Palay, Chan-Palay, 2011). Пузырьки могут иметь различную форму и содержат нейротрансмиттерные вещества, связанные с белком-носителем. Содержимое высвобождается в синаптическую щель путем слияния пузырька с пресинаптической клеточной мембраной, которое регулируется потенциалом действия и локальной концентрацией ионов кальция.

1.2.1. Нарушение структуры нейронов при нейродегенеративных заболеваниях

Нейродегенеративные заболевания характеризуются прогрессирующей гибелью уязвимой популяции нейронов, в отличие от неизбирательной гибели нервных клеток при токсических и метаболических заболеваниях (Shang et al., 2022). Нейродегенеративные заболевания классифицируют в соответствии с основными клиническими особенностями (например, деменция, паркинсонизм, заболевания моторных нейронов), по анатомической области, затронутой нейродегенерацией (например, лобнотемная дегенерация, экстрапирамидные заболевания или спиноцеребеллярная дегенерация) или по основному нарушению на молекулярном уровне, приводящему к развитию заболевания. Наиболее распространенные нейродегенеративные заболевания — это амилоидозы, таупатии (например, болезнь Альцгеймера (БА), вызванная накоплением β -амилоида $A\beta$ и тау-белка), α -синуклеинопатии (например, болезнь Паркинсона (БП), при которой происходит агрегация белка α -синуклеина с образованием телец Леви) и TDP-43 протеинопатии. Нарушенные белки при этих заболеваниях имеют аномальную конформацию (Dugger, Dickson, 2017).

Несмотря на клинические, анатомические и молекулярные различия, на клеточном уровне процессы нейродегенерации при различных заболеваниях имеют схожие черты (Kanazawa, 2001). Важную информацию о процессе дегенерации нейронов дало изучение выживших нейронов в постмортальных образцах пациентов с нейродегенеративными заболеваниями. Так, например,

у пациентов с БП через 20 лет после начала заболевания остается менее 20% нейронов черной субстанции. Эти выжившие нейроны демонстрируют различные признаки дегенерации, такие как уменьшение размеров, изменение формы, нарушение морфологии тела клетки, дегенерацию отростков (Kanazawa, 2001). Отмечено, что, плотность дендритных ветвей большинства корковых нейронов уменьшается даже на ранней стадии БА (Mehraein et al., 1975). Кроме того, в коре при БА было замечено значительное уменьшение количества дендритных шипиков и синаптических окончаний (Davies et al., 1987). Было также показано, что выжившие нейроны черной субстанции при БП часто демонстрируют конденсацию цитоплазмы, инвагинации оболочки ядер, апоптотическую фрагментацию клеток и аутофагическую дегенерацию (Anglade, 1997). При боковом амиотрофическом склерозе (БАС) оставшиеся спинальные мотонейроны уменьшаются в размере примерно на 70–80% (Kiernan, Hudson, 1993). Напротив, выжившие нейроны стриатума при БХ демонстрируют незначительное сморщивание, но часто обнаруживают инвагинации ядерной оболочки (Roos, Vots, 1983). Известно, что потеря нейронов происходит медленно, и таким образом большое количество нейронов выживает более 3–10 лет в атрофическом и/или деформированном состоянии. Эти «больные» нейроны могут поддерживаться на более низком метаболическом и функциональном уровнях, чем клетки, не затронутые патологией (Anglade, 1997).

Потеря дендритных шипиков наблюдается при множестве нейродегенеративных заболеваний (Herms, Dorostkar, 2016). Выделяют несколько основных причин этого. Во-первых, при дегенерации нервной ткани, гибели нейронов и уменьшении количества дендритов, шипики образуют меньше контактов и разрушаются «за ненадобностью». Этот механизм предполагается для БА и таупатий (Koffie et al., 2009; Wu et al., 2010). Во-вторых, потерю шипиков может вызывать негативный эффект агрегатов дефектных белков на гомеостаз кальция, что наблюдается,

например, при БА (Lashuel, Lansbury, 2006). В-третьих, показано, что дефектные белки могут оказывать влияние на глутаматные рецепторы, способствуя увеличенному притоку ионов кальция из-за гиперактивации рецепторов (эксайтотоксичности), например, при таупатиях и БХ (Diógenes et al., 2012). При α -синуклеинопатиях, например, БП, уменьшение количества шипиков, принимающих сигналы, как предполагают, объясняется снижением синаптической активности нейронов. Нарушение передачи синаптического сигнала в пресинаптическом окончании, как считается, происходит из-за формирования агрегатов, включающих кроме α -синуклеина (Kramer, Schulz-Schaeffer, 2007) и другие структурные белки синапса, например синапсин (Scott et al., 2010), а также дисфункции везикулярного транспорта (Soper et al., 2008) и механизма высвобождения везикул в области синапса (Larsen et al., 2006). Это сопровождается ингибированием высвобождения нейротрансмиттеров и дисфункцией синапсов (Nemani et al., 2010), что нарушает функционирование аксонов, приводящее к уменьшению входящих сигналов, и способствует деградации шипиков.

Цитоплазматические органеллы нейронов также вовлекаются в процесс развития нейродегенеративных заболеваний. Эндоплазматический ретикулум, являющийся важной органеллой для синтеза, правильного фолдинга, посттрансляционной модификации и транспорта белков, имеет решающее значение для нормального функционирования клеток (Sree et al., 2021). Нарушение этих функций, например, накопление белков с неправильной конформацией, изменение гомеостаза кальция в цистернах, приводят к так называемому стрессу ЭПР (Perner, Krüger, 2022). При этом активируются сигнальные пути, включая реакцию несвёрнутых белков (unfolded protein response, UPR), которая изменяет экспрессию специфических белков, таких как шапероны, усиливается деградация мутантных или поврежденных белков и ингибируется синтез белка (Rao et al., 2004).

При нейродегенеративных заболеваниях отмечается также фрагментация аппарата Гольджи (АГ), что является очень ранним событием,

происходящим ещё до проявления клинических симптомов, при таких заболеваниях, как БП, БА и БАС (Liu et al., 2021). Фрагментацию АГ может вызвать дисбаланс между входящим и исходящим транспортом везикул (Liu et al., 2021). Показано, что формирование стопок АГ требует непрерывного обмена белков между АГ и ЭПР (Lippincott-Schwartz et al., 2000). Ингибирование везикулярного транспорта из АГ к плазматической мембране может приводить к накоплению белка внутри диктиосом и фрагментации АГ (Zolov, Lupashin, 2005; Preston et al., 2009; Zhou et al., 2013).

Нарушение функционирования митохондрий также играет важную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, особенно их спорадических форм. Накопление активных форм кислорода, АФК, недостаточность АТФ и потенциальное разрушение митохондриальной мембраны приводят к открытию Ca^{2+} -зависимых митохондриальных пор, высвобождению цитохрома С и апоптозу (Humphries, Szweda, 1998; Filosto et al., 2011). Так называемая гипотеза митохондриального каскада развития спорадической БА (Swerdlow et al., 2010) предполагает этот механизм в качестве первичной причины развития заболевания, которая приводит к формированию β -амилоида с нарушенной структурой (Swerdlow, Kish, 2002). Ещё один предполагаемый механизм влияния функциональных нарушений митохондрий на развитие нейродегенеративных заболеваний это нарушение процесса слияния и деления митохондрий, который является своеобразным контролем качества этих органелл. Было показано, что при изучении строения митохондрий в нейронах при БА наблюдались более длинные митохондрии, что свидетельствовало о нарушении баланса митохондриальной динамики в пользу слияния (Wang et al., 2008a). Также в процессе слияния и деления митохондрий играют роль белки, являющиеся ключевыми для патогенеза БП, паркин, заякоренный в наружной мембране митохондрий, и PINK1 (Deng et al., 2008; Poole et al., 2008; Yang et al., 2008). Кроме того, правильное распределение митохондрий на периферии важно для нейронов, которым требуется производство энергии в местах, удаленных

от тела клетки, таких как аксоны и дендриты (DiMauro, Schon, 2008). Показано, что в нейронах гиппокампа, моделирующих БА, распределение митохондрий нарушалось, они накапливались в перинуклеарной области, тогда как в более отдаленных частях клетки они отсутствовали (Wang et al., 2008b). Нарушение контроля качества митохондрий посредством митофагии также может быть важным фактором для развития нейродегенеративных заболеваний. В процесс митофагии вовлечены белки, мутации в которых приводят к наследственным формам БАС и БП (ТВК1 и паркин, соответственно) (Filosto et al., 2011).

Изменения в местах контакта между ЭПР и митохондриями, так называемых МАМ (митохондриально - ассоциированных мембран), описаны как общая характеристика многих нейродегенеративных заболеваний (Vallese et al., 2020). Патогенные мутации *PS2*, ассоциированные с одной из форм БА, были связаны с увеличением контактов ЭПР и митохондрий, и усиленным переносом Ca^{2+} в области этих контактов (Zampese et al., 2011; Kiranyula et al., 2012). Показано, что при инкубации первичных нейронов гиппокампа с наномолярными концентрациями олигомерного β -амилоида усиливаются контакты мембран ЭПР и митохондрий и обмен Ca^{2+} между этими органеллами (Hedskog et al., 2013). С использованием различных клеточных моделей БП было показано, что α -синуклеин играет ключевую роль в контактах ЭПР и митохондрий, способствуя переносу Ca^{2+} между органеллами (Cali et al., 2012; Guardia-Laguarta et al., 2015; Ottolini et al., 2017), а белок паркин способствует усилению взаимодействий ЭПР и митохондрий (Cali et al., 2013). Один из белков, ассоциированных с развитием БАС, VAPB, часто встречается в МАМ (DeVos et al., 2012), участвует в регуляции стресса ЭПР и последующей Ca^{2+} -опосредованной гибели двигательных нейронов (Langou et al., 2010), важен для поддержания переноса Ca^{2+} между ЭПР и митохондриями, его мутация вызывает нарушение захвата Ca^{2+} митохондриями, повышение уровня Ca^{2+} в цитозоле (DeVos et al., 2012; M6rotz et al., 2012). Сверхэкспрессия как дикого, так и

мутантного белка TDP-43, ассоциированного с БАС, снижает физическую и функциональную связь ЭПР и митохондрий, нарушая функцию VAPB (Stoica et al., 2014). Сверхэкспрессия мутантного hSOD1, также ассоциированная с БАС, как было обнаружено, нарушает обмен Ca^{2+} между ЭПР и митохондриями в двигательных нейронах эмбрионов мыши (Parone et al., 2013). Таким образом, представленные данные показывают, что при различных нейродегенеративных заболеваниях нарушения контактов ЭПР с митохондриями имеют большое значение.

Показано, что многие нарушения структуры и функции различных органелл при нейродегенеративных заболеваниях связаны с гомеостазом кальция (Schrank et al., 2020). Кальциевый сигналинг имеет решающее значение для функции нейронов и регулирует самые разнообразные процессы, такие как транскрипция генов, энергетический обмен, синтез белков, а также играет важную роль в организации и функции синапсов. Специфические причины нарушения регуляции кальция, обусловленные определенными нейронными компартментами или ионными каналами, были продемонстрированы для таких заболеваний, как БА, БП и БХ (Schrank et al., 2020). Недавние исследования показали, что при БХ значительно повышен один из основных сигнальных путей Ca^{2+} , депо-управляемый вход Ca^{2+} (store operated calcium entry, SOCE). К SOCE относится приток Ca^{2+} в клетки в ответ на истощение запасов Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме (Czeredys, 2020). В стриатуме у трансгенных мышей YAC128 моделей БХ повышение SOCE приводит к потере постсинаптических дендритных шипиков СШН (Wu et al., 2016). Фармакологическое ингибирование nSOCE может быть потенциальным способом блокирования нейродегенерации. Одним из таких ингибиторов является 6-амино-4-(4-феноксифенетиламино)хиназолин (EVP4593) (Wu et al., 2016). Применение EVP4593 нормализовало двигательное поведение в модели БХ у мух и оказывало нейропротекторное действие в анализе токсичности глутамата в культурах клеток стриатума мышей линии YAC128 (Wu et al., 2016).

Критическую роль аутофагии в поддержании гомеостаза и контроля качества белков в нейронах убедительно доказывает исследование, в котором мутации в генах, кодирующих белки Atg5 и 7, на мышинных моделях нарушали аутофагию в нервных клетках и приводили к накоплению белковых включений и нейродегенерации (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Wong, Cuervo, 2010). Активация аутофагии различными путями, например, с помощью комбинации рапамицина и трегалозы, продемонстрировала нейропротекторный эффект на мышинной модели БП, индуцированной нейротоксином 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП). Предполагается, что активация аутофагии устраняет как нейрональные дофаминергические, так и поведенческие нарушения *in vivo* и, по-видимому, является многообещающей терапией БП-подобной патологии (Puryshev et al., 2019). При аутофагии существует баланс формирования аутофагосом и их превращения в аутолизосомы, и нарушение этого процесса при нейродегенеративных заболеваниях может происходить на разных стадиях. С такими заболеваниями, как БА (Nixon et al., 2005; Zhang et al., 2013), БП (Stefanis et al., 2001) и БХ (Shibata et al., 2006), связано накопление аутофагосом в нейронах, которое свидетельствует о дисбалансе между образованием аутофагосом и аутолизосом. Снижение активности лизосомальных гидролаз или увеличение рН приводит к ингибированию аутофагической деградции при нейродегенеративных заболеваниях (Shen, Mizushima, 2014). Например, дисфункция белка пресенилин 1, связанная с семейной формой БА, вызывает нарушение закисления лизосом (Lee et al., 2010), что приводит к ингибированию протеолиза в аутолизосомах и проявляется в виде накопления аутофагосом.

1.3. Подходы и методы, используемые для изучения механизмов развития нейродегенеративных заболеваний

Нейродегенеративные заболевания представляют серьезную проблему для современного здравоохранения (Slanzi et al., 2020). Ограниченная

эффективность лекарств от нейродегенераций отражает их сложную этиологию и патогенез. Кроме возраста, множество факторов риска могут вносить вклад в развитие этих синдромов, включая окружающую среду и генетический фон. Разработка эффективных методов лечения этих заболеваний требует понимания причин и механизмов нейропатологий, а также выявления молекулярных механизмов, лежащих в основе их развития. Для исследования этих механизмов и поиска мишеней для терапевтических методов, необходимо использование модельных систем, воспроизводящих основные характеристики той или иной болезни. Для изучения нейродегенеративных заболеваний много лет использовались такие экспериментальные модельные организмы как мыши, дрозофилы, нематоды и даже пекарские дрожжи, и именно с помощью них были сделаны ключевые открытия в механизмах этих патологий (Uradhayau et al., 2023).

Открытие гена, ответственного за развитие БХ в 1993 (MacDonald et al., 1993), позволило методами генетической инженерии создать организмы-модели БХ: дрожжей, нематод, плодовых мушек, рыбок данио а также множества млекопитающих животных - мышей, крыс, овец, свиней, и приматов (Farshim, Bates, 2018). Наибольшее распространение среди моделей из млекопитающих получили мыши, благодаря относительной простоте редактирования их генома и быстрой смене поколений. Это позволило изучать ранние стадии развития болезни, которые невозможно исследовать на постмортальных образцах пациентов. На сегодняшний день существует целый ряд линий мышей, моделирующих БХ, которые отличаются по способу создания. Линии мышей R6/1, R6/2, N171-82Q и Tg100 имеют 5'-участок гена *HTT* человека, синтезирующий N-концевой фрагмент белка Htt (Farshim, Bates, 2018). Другие линии несут целый человеческий ген, встроенный в искусственную хромосому дрожжей (YAC), например YAC128, или искусственную бактериальную хромосому (BAC), например BACHD (Farshim, Bates, 2018). Наиболее точно воспроизводящими патологический фенотип являются линии мышей, у которых мутация,

вызывающая БХ, внесена непосредственно в ген *HTT* мыши, например HdhQ150 или HdhQ111 (Farshim, Bates, 2018). Этот набор моделей интенсивно используется в исследованиях патологических основ БХ и для доклинических исследований (Farshim, Bates, 2018). Несмотря на популярность животных моделей нейродегенеративных заболеваний, их применение имеет ряд сложностей. Кроме этических проблем использования животных в медицинских экспериментах, недавние неудачные клинические исследования подняли вопрос о невозможности переноса данных из экспериментов с животными на человека (Slanzi et al., 2020). Таким образом, требуется разработка новых исследовательских инструментов в этой области. В настоящее время создаются новые *in vitro* модели, которые позволят заполнить пробел между текущими доклиническими исследованиями на животных и клиническими испытаниями на пациентах. Кроме того, тестирование *in vitro* может уменьшить продолжительность и стоимость переноса результатов за счёт идентификации механизма действия препаратов и сопутствующих рисков (Slanzi et al., 2020).

Разработка некоторых *in vitro* подходов для исследования этиологии и патогенеза широкого спектра нейродегенеративных заболеваний началась около 60 лет назад. В 1962 была создана первая органотипическая культура ЦНС из тканей гиппокампа крысы (Bousquet, Meunier, 1962). Клетки, выделенные из спинного мозга и ганглиев эмбрионов крысы, культивировались на стеклах, покрытых коллагеном, что продемонстрировало возможность их использования для органотипической дифференцировки, а биоэлектрические свойства этих препаратов были подходящими для электрофизиологических исследований (Crain, 1966). С этого времени органотипические культуры были получены из срезов разных зон мозга, включая некоторые отделы мозжечка, гиппокамп, черную субстанцию, голубое пятно, стриатум, базальный передний мозг (LaVail, Wolf, 1973; Whetsell, Schwarcz, 1983; Knöpfel et al., 1989; Østergaard et al., 1995; Robertson et al., 1997).

Преимуществом тканевых эксплантов и культур органотипических срезов является то, что они достоверно воспроизводят архитектуру нервной ткани. В то же время, такие культуры сложно создавать и поддерживать в жизнеспособном состоянии, а присущая им вариабельность ведет к снижению воспроизводимости результатов исследований (Walsh et al., 2005). Разработка иммортализованных клеточных линий убрала необходимость использовать ткани как источник материала, однако такие клетки часто имели генетические и метаболические аномалии по сравнению с нормальными клетками человека (Gordon et al., 2014). Получение эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека (Thomson, 1998) и, позднее, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) (Takahashi et al., 2007) обеспечило исследователей возможностью создавать множество дифференцированных типов клеток с одним и тем же генотипом. Метод превращения соматических клеток человека в ИПСК с использованием ретровирусной трансдукции транскрипционными факторами OCT4, SOX2, KLF4 и c-MYC открыл новые перспективы в развитии моделей заболеваний *in vitro*, так как ИПСК могут быть получены от пациентов. Это позволяет создавать культуры нейронов, несущие схожие генетические варианты, связанные с патогенезом заболевания, в разном генетическом окружении (Slanzi et al., 2020).

Разработка новой революционной технологии прямого редактирования генома сделала возможным моделировать и изучать человеческие заболевания на клеточном и молекулярном уровнях. Методы редактирования генома, такие как нуклеазы с цинковыми пальцами ZFNs (Zinc-finger nucleases) (Kim et al., 1996), TALEN (transcription activator-like effector nuclease) (Miller et al. 2011), системы основанные на CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) (Cong et al., 2013; Kim et al., 2016; Kleinstiver et al., 2016), NgAgo-gDNA (DNA-guided endonuclease Argonaute *Natrono bacterium gregoryi*) (Gao et al., 2016) и SGN (structure-guided nuclease) (Xu et al., 2016) открывают новые возможности для научных

исследований, благодаря способности непосредственно изменять последовательность ДНК и экспрессию целевых генов. Таким образом, эти инструменты могут быть успешно использованы для моделирования БХ. Например, можно создавать генетически изогенные клеточные линии, несущие разное количество CAG повторов или, наоборот, корректировать мутации, вызывающие болезнь, в пациент-специфичных клетках. Изогенные линии являются наилучшей платформой для исследования заболевания и тестирования терапевтических методов (Alkanli et al., 2023).

Различные клеточные модели нейродегенеративных заболеваний являются объектом целого арсенала методов исследования от физиологических до молекулярно-биологических. Особую роль среди этих методов играет просвечивающая электронная микроскопия, позволяющая визуализировать патологические изменения на субклеточном уровне. Просвечивающая электронная микроскопия сыграла большую роль в определении функции Htt в клетке. Когда ген, мутация в котором приводила к БХ, был идентифицирован, не было обнаружено его гомологов, и не было понятно, какую функцию он выполняет в клетке, и как мутация в нем приводит к нейродегенерации. Наличие полиглутаминового тракта, часто встречающегося у транскрипционных факторов, а также сигнала ядерной локализации, позволили предположить, что Htt участвует в транскрипции (DiFiglia et al., 1995). Действительно, иммуногистохимическими методами было показано, что Htt локализуется в ядрах и цитоплазме нейронов, тогда как в других соматических клетках только в цитоплазме (Hoogeveen et al., 1993). Позднее, с помощью меченных золотом антител, было продемонстрировано, что Htt в цитоплазме нейронов взаимодействует с мембранными органеллами и транспортными везикулами (DiFiglia et al., 1995).

Долгое время считалось, что именно агрегаты mHtt нарушают структуру и функцию клетки, что приводит к нейродегенерации (Davies, Turmaine, 1997; Ross, 1997), поскольку при других polyQ заболеваниях

(например, спиноцеребеллярный атаксии) формирование агрегатов совпадало с развитием симптомов (Paulson et al., 1997; Skinner et al., 1997; Holmberg et al., 1998). Именно с использованием метода электронной микроскопии было показано, что процесс формирования ядерных агрегатов при мутации в гене *HTT* происходит задолго до гибели нейронов (Gutekunst et al., 1999). Более того, было отмечено, что агрегаты чаще наблюдаются в клетках областей наименее затронутых патологией, что позволило предположить, что формирование агрегатов происходит в нейронах, которые с меньшей вероятностью погибнут (Gutekunst et al., 1999). Электронная микроскопия позволила также исследовать процесс формирования агрегатов mHtt как в ядре и цитоплазме клеток, так и в нейропили, где они взаимодействовали с микротрубочками и транспортными везикулами, что позволило предположить их роль в нарушении аксонального транспорта (Li et al., 1999).

Позднее электронная микроскопия помогла выяснить роль Htt в процессе селективной аутофагии. Мартинес-Висенте с соавт. наблюдали снижение уровня деградации белка при голодании в клетках мышей с увеличенным числом повторов в гене *HTT* (Martinez-Vicente et al., 2010). При этом на уровне флуоресцентной микроскопии количество LC3 (убиквитин-подобный белок, вовлечённый в формирование аутофагосом) позитивных структур увеличивалось, что говорило об усилении активности аутофагии. Решить это противоречие помогла электронная микроскопия, позволившая установить, что формирующиеся аутофагосомы содержат мало включений. Это позволило исследователям понять, что нарушен процесс захвата содержимого аутофагосомой (Martinez-Vicente et al., 2010).

Следует отметить, что большинство перечисленных исследований были сконцентрированы на изучении нарушений функций конкретных клеточных структур, и до настоящего времени не было проведено комплексного изучения ультраструктурной динамики и нарушений органелл в клетках при БХ. Данная работа впервые обобщает изменения ультраструктуры клеток и представляет сравнительный анализ структурной

организации клеток с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* в составе нескольких клеточных моделей БХ.

Заключение

БХ с одной стороны имеет схожие черты с другими нейродегенеративными заболеваниями по механизму деградации нервной ткани. С другой стороны, четкая генетическая детерминированность, обусловленная мутацией всего одного гена, отличает её от других нейродегенераций, часто имеющих спорадический характер с очень редкими генетически обусловленными вариантами. Это делает БХ существенно важной для изучения не только её собственного патогенеза, но и процесса нейродегенерации в целом.

Несмотря на широту применения животных моделей для изучения нейродегенеративных заболеваний, они имеют ряд ограничений. Таким образом, необходима разработка подходящих *in vitro* моделей, которые помогли бы заполнить пробел между результатами исследований на животных и клиническими испытаниями на людях. Наиболее перспективными в этом смысле являются клеточные модели, созданные на основе плюрипотентных клеток человека, из которых могут быть дифференцированы любые клеточные типы. В патогенезе БХ важную роль играют генетические факторы, поэтому немаловажно исследовать как культуры пациент-специфичных клеток, так и изогенные генетически модифицированные линии клеток, нивелирующие генетический фон. Кроме того, поскольку согласно ряду исследований, развитие нейродегенерации обусловлено соматической экспансией CAG повторов в пермиссивных клетках, необходимо исследовать линии с крупными встройками этих повторов.

В настоящей работе проведено детальное сравнительное электронно-микроскопическое и морфометрическое исследование ультраструктурных нарушений в клетках нейрональных клеточных культур с увеличенным

числом CAG повторов в гене *HTT*: пациент-специфичных нейронов (МА2 с 47 CAG повторами и Че3 с 42 CAG повторами) и генетически модифицированных нейронов (69Q9T и 69Q25L с 69 CAG повторами), а также генетически модифицированных клеточных линий HEK293, содержащих 100-150 CAG.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика клеточных культур, использованных в работе

2.1.1. Культуры нейронов пациент-специфичной клеточной модели болезни Хантингтона

Пациент-специфичная клеточная модель болезни Хантингтона была получена и любезно предоставлена нашими коллегами из лаборатории генетических основ клеточных технологий института общей генетики им. Н. И. Вавилова Некрасовым Е.Д., Лагарьковой М.А., Киселевым С.Л. Фибробласты были получены от двух пациенток с клинически диагностированной болезнью Хантингтона и малым (42, 47) количеством CAG-повторов в мутантном аллеле, проходящих наблюдение в ФБГУ «Научный центр неврологии» в г. Москва. Количество CAG повторов для фибробластов линии MA2 составляло 47 повторов в одном аллеле и 16 в другом, а для линии ЧеЗ 42/27 (Таблица 1). Полученные из фибробластов кожи пациентов линии ИПСК имели нормальный стабильный кариотип 46XX, количество CAG повторов в гене *HTT* не отличалось от исходного. В качестве контроля использовались нейроны, дифференцированные из линии ЭСК человека ES5 (чтобы исключить влияние лентивирусной трансдукции), а также из линии ИПСК iPS12 из эндотелиоцитов здорового пациента (чтобы исключить влияние соматической памяти), ранее полученные и охарактеризованные в лаборатории, они содержали менее 20 CAG повторов (Таблица 1) (Некрасов и др., 2011). Полученные с помощью направленной дифференцировки нейроны экспрессировали нейрональные маркеры *TUBB3* и *DARPP-32*, *PPP1R1B*, *GAD1*, *DRD1*, *BCL11B*, *CALB1*, *SST*, *RASD2*, *PENK*, *ANO3*, *PDYN* известные специфические маркеры срединных шипиковых нейронов стриатума, также была продемонстрирована экспрессия *HTT* и синтез ГАМК нейронами (Nekrasov et al., 2016).

Также были предоставлены культуры контрольных нейронов ES5 и пациент-специфичных MA2 с 47 CAG повторами в гене *HTT*, инкубированные в течение 14 часов с 1 мкМ EVP4593.

2.1.2. Культуры генетически модифицированных нейронов клеточной модели болезни Хантингтона

Нашими коллегами из лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН Маланхановой Т.Б., Григорьевой Е.Г и Малаховой А.А в эмбриональные фибробласты с 22/20 CAG повторами в гене *HTT* была внесена встройка дополнительных повторов. В результате был получен клон, несущий 69 повторов в одном аллеле и 20 в другом. Наличие целевой замены и отсутствие нецелевых модификаций было подтверждено с помощью секвенирования по Сэнгеру. Вестерн-блот продемонстрировал синтез mHtt в этом клоне. В полученных ИПСК было подтверждено количество повторов. Для дальнейшей работы были выбраны клоны ИПСК, имевшие стабильный кариотип 46XX. Полученные после направленной дифференцировки изогенные культуры СШН 69Q9T и 69Q25L (Таблица 1) экспрессировали MAP2 - маркер зрелых нейронов, синапсин 1 (SYN1) - фосфопротеин участвующий в формировании и функционировании синапсов, а также ГАМК (GABA) - нейромедиатор СШН, ген *SYP*, кодирующий пресинаптический маркер синаптофизин; *GAD1*, кодирующий глутамат декарбоксилазу 1, синтезирующую ГАМК; гены-маркеры нейронов стриатума *ARPP21*, *CALB1*, *FOXP2*, *DRD1* и *DRD2*. Из исходной линии фибробластов через ИПСК также была получена культура нейронов iMA1L, которая использовалась в качестве изогенного контроля (Malankhanova et al., 2020a). В качестве дополнительного контроля использовалась культура нейронов r2LF, дифференцированная из ИПСК, полученных из мононуклеаров здорового донора (Таблица 1).

экспе- римент		название культуры клеток	источник, из которого дифференцированы нейроны	коли- чество повторов	публикация с характеристи- кой культуры
пациент-специфичная модель	К	ES5	ЭСК человека	<20	Nekrasov et al., 2016
	К	iPS12	ИПСК, полученные из эндотелиоцитов здорового человека	<20	Nekrasov et al., 2016
	О	MA2	ИПСК, полученные из фибробластов кожи пациента с БХ	47/16	Nekrasov et al., 2016
	О	Че3	ИПСК, полученные из фибробластов кожи пациента с БХ	42/27	Nekrasov et al., 2016
генетически модифицированная модель	К	iMA1L	ИПСК, полученные из нормальных эмбриональных фибробластов MA№1	22/20	Grigor'eva et al., 2020 Malankhanova et al., 2020
	К	r2LF	ИПСК, получение из мононуклеаров здорового человека	<20	Malakhova et al., 2020
	О	69Q9T	ИПСК, полученные из эмбриональных фибробластов 2D12 со встройкой 69 CAG повторов	69/20	Malankhanova et al., 2020
	О	69Q25L	ИПСК, полученные из эмбриональных фибробластов 2D12	69/20	Malankhanova et al., 2020
трансенная встройка большого количества повторов	К	HEK293 Phoenix	культура клеток эмбриональной почки человека	<30	Suldina et al., 2018
	О	6H	HEK293Phoenix с трансенной встройкой	100-150	Suldina et al., 2018
	К	HEK293 FT	культура клеток эмбриональной почки человека	<30	(Malankhanova et al., 2020b)
	О	F1	HEK293FT с трансенной встройкой	100-150	(Malankhanova et al., 2020b)

Таблица 1. Краткая характеристика клеточных культур, использованных в работе. К – контрольные клетки; О – клетки с увеличенным количеством CAG повторов в гене *HTT*

2.1.3. Линии клеток НЕК293 со встройкой большого количества CAG повторов в ген *HTT*

Внесение большого числа CAG повторов в геном клеток НЕК293 (Human Embryonic Kidney 293) – лабораторной культуры клеток эмбриональной почки человека, было выполнено аналогично фибробластам. Наличие встройки определяли с помощью ПЦР и более точно с помощью капиллярного электрофореза. Экспрессия мутантного белка была подтверждена с помощью вестерн-блота. Наличие целевых и отсутствие нецелевых замен было подтверждено секвенированием по Сэнгеру

2.2. Фиксация и заключение образцов для электронной микроскопии

Нейроны и клетки НЕК293 были выращены на специальных пластиковых подложках (Agar Scientific, Великобритания) в соответствующих условиях (Malankhanova et al., 2020). Клетки предварительно фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида (Fluka, Швейцария), приготовленного на культуральной среде, в течение 15 минут, а затем 1 ч. в 2.5 % растворе глутаральдегида на 0.1 М натрий-какодилатном буфере (pH 7.3) (Fluka, Швейцария), при комнатной температуре. Затем клетки отмывали от фиксатора тем же буфером 3 раза по 5 минут и дополнительно фиксировали в 1 %-ном растворе тетроксиде осмия (ОАО Аурат, Россия) на том же буфере в течение 1 часа при комнатной температуре. После фиксации клетки отмывали в трех сменах дистиллированной воды, инкубировали в 1 % водном растворе уранилацетата (Serva, Германия) в течение ночи в холодильнике в темноте. После этого образцы дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации (30 % - 5 мин; 50 % - 5 мин; 70 % - 10 мин; 96 % - 10 мин дважды) и затем в обезвоженном ацетоне (в двух сменах по 10 мин

каждая). Дегидратированные образцы пропитывали смесью эпоксидной смолы Агар-100 (10 мл смеси смолы включала: 6 г Agar-100 Resin, 4 г DDSA, 2,5 г. MNA, 0,25 г DMP-30, Fluka, Швейцария) с добавкой ацетона по следующей схеме:

Агар:ацетон – 1:2 – 1 час;

Агар:ацетон – 1:1 – 2 часа;

Агар:ацетон – 2:1 – 2 часа;

Чистая смесь Агар –100 – 1 час.

Все стадии фиксации и пропитки проводили при непрерывном перемешивании на автоматической качалке. После этого образцы заливали свежей порцией чистой смеси эпоксидной смолы и помещали в эксикатор с CaCl_2 на ночь, после чего переносили в термостат при $+60^\circ \text{C}$ на двое суток для полимеризации.

2.3. Получение и окрашивание полутонких и ультратонких срезов

Полутонкие срезы толщиной 0,5 мкм получали на ультратоме Ultracut E (Reichert-Jung, Австрия). Полученные срезы окрашивали метиленовым синим. Ультратонкие срезы толщиной 50-80 нм получали на ультратоме Leica EM UC7U (Leica, Австрия). Полученные срезы снимали на медные сеточки, промытые в ацетоне. Ультратонкие срезы были исследованы в электронном микроскопе Jem-1400 (JEOL, Japan) с камерой Veleta camera (Olympus, USA) с использованием программного обеспечения iTEM 5.1 (Olympus, USA).

2.4. Морфометрический анализ

В рамках морфометрического анализа оценивали относительное число аутолизосом и синаптических везикул на единицу площади цитоплазмы и синаптического окончания, соответственно; процентное соотношение митохондрий с различными типами нарушений, а также контактирующих с

мембранами ЭПР; среднюю длину шипиков и частоту их расположения на отростке нейрона; средняя площадь синаптических везикул.

Процентное соотношение подсчитывалось для оценки доли митохондрий, контактирующих с мембранами ЭПР, а также с разными типами нарушений – разрежением матрикса и деформацией крист, а также дефектами оболочки. Количество типичных и имеющих различные нарушения митохондрий подсчитывалось на микрофотографиях тел не менее чем 20 клеток для каждой экспериментальной группы при увеличении $\times 20\,000$, а затем определялась доля органелл (в %) с тем или иным дефектом от общего числа митохондрий на срезе клетки (Suldina et al., 2021). Статистической обработке подвергались значения долей для отдельных клеток, на соответствующих гистограммах указаны средние значения. Аналогично оценивалась доля митохондрий, контактирующих с ЭПР.

Относительное число аутолизосом и синаптических везикул оценивалось как количество структур на площадь сечения цитоплазмы перикариона и синаптического окончания, соответственно. Для этого с помощью программы ImageJ (USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) была измерена площадь перикариона не менее чем 20 клеток в каждой экспериментальной группе на увеличении $\times 5\,000$ и не менее чем 10 синаптических окончаний на увеличении $\times 30\,000$. Подсчитано количество структур и разделено на полученное значение площади. Длина шипиков и дендритов была измерена для не менее чем 10 нейронов в каждой исследованной культуре с помощью ImageJ, плотность шипиков определялась как отношение количества шипиков на отростке к его длине.

Для статистического анализа морфометрические данные были проверены на нормальность распределения с помощью теста Шапиро-Уилка, и при ненормальном распределении достоверность различий сравниваемых средних величин проверяли по критерию Манна-Уитни (Malkeyeva et al., 2022)

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Ультраструктура пациент-специфичных нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*

На первом этапе наших исследований, с целью выявления морфологических нарушений, возникающих при естественном развитии болезни Хантингтона у человека, была изучена морфология пациент-специфичных средних шипиковых нейронов стриатума с небольшим числом CAG повторов в гене *HTT* (культуры MA2 с 47/16 CAG повторами и Че3 с 42/27 CAG повторами (Таблица 1)). В качестве контроля мы исследовали культуры нейронов ES5 и iPS12 (Таблица 1).

3.1.1. Электронно-микроскопический анализ морфологии нейронов, дифференцированных из здоровых клеток и клеток пациентов с болезнью Хантингтона

Исследование структурной организации нейронов в составе контрольных культур ES5 и iPS12 выявило типичную для этого типа клеток морфологию. Они представляли собой нейроны с одним аксоном и, как правило, 1-2 дендритами (Рис. 1). Нейроны имели овальное или треугольное тело с ядром, содержащим 1-3 некрупных ядрышка (Рис. 2, а, г). В околоядерной зоне цитоплазмы выявлялись тельца Ниссля, представлявшие собой небольшие стопки шероховатого ЭПР (Рис. 2, б, д). В цитоплазме и в отростках присутствовали нейрофиламенты, как отдельно лежащие, так и собранные в пучки (Рис. 2, в, е). Удлиненные митохондрии имели плотный матрикс, узкие и расширенные кристы (Рис. 3, а, е). У небольшого количества из них наблюдались выпячивания оболочки (Рис. 3, б, ж), также некоторые контактировали с цистернами ЭПР (Рис. 3, в, з). Шероховатый ЭПР в телах нейронов имел типичное строение (Рис. 3, г, и), гладкий был представлен короткими и узкими цистернами (Рис. 3, д, к). Стопки АГ состояли из узких диктиосом и скоплений везикул (Рис. 4, а, е). В цитоплазме

присутствовали аутолизосомы различного размера, мелкие (от 0,2 до 0,6 мкм в диаметре) с содержимым средней плотности (Рис. 4, б, ж), крупные содержали остатки органелл, фрагменты мембран и везикулы, (Рис. 4, в, з). Выявлялись шипики на дендритах нейронов (Рис. 4, г, и), а также синапсы (Рис. 4, д, к).

На ультратонких срезах нейронов культур МА2 (47 САГ повторов) и Че3 (42 САГ повтора), полученных из клеток пациентов с болезнью Хантингтона, чаще чем в контроле обнаруживались клетки с крупными ядрами неправильной формы и большим количеством глубоких инвагинаций (Рис. 5, а, г). При этом их общая морфология и форма клеток были схожи с контролем, в цитоплазме также выявлялись такие типичные для нейронов структуры, как тельца Ниссля (Рис. 5, б, д) и нейрофиламенты (Рис. 5 в, е). Митохондрии часто имели различные структурные дефекты, такие как выпячивания оболочки (Рис. 6, а-б, е-ж) и разрежения матрикса, сопровождавшиеся нарушением распределения крист (Рис. 6, в, з). Чаще, чем в контроле, наблюдались контакты митохондрий с цистернами ЭПР (Рис. 6, г-д, и-к).

В пациент-специфичных нейронах с увеличенным числом САГ поторов в гене *HTT* комплексы ЭПР и АГ были развиты заметно сильнее, чем в контроле. В цитоплазме присутствовало множество цистерн шероховатого ЭПР, их просвет был более расширен (Рис. 7, а, д), чем в нейронах контрольных культур. Короткие цистерны гладкого ЭПР имели иногда крупные пузырьковидные расширения (Рис. 7, б, е-ж) и часто были окружены скоплениями мелких везикул (Рис. 7, в, з). Стопки АГ состояли из узких и длинных диктиосом, в области которых выявлялись крупные светлые расширения (Рис. 7 г, и), не наблюдавшиеся в АГ контрольных нейронов.

В цитоплазме нейронов культур МА2 и Че3 присутствовали многочисленные мелкие аутолизосомами с содержимым средней плотности (Рис. 8, а, д), а также большое количество крупных аутолизосом, внутри которых наблюдались остатки органелл или гетерогенный матрикс средней

плотности (Рис. 8, б-в, е, ж). Многие крупные аутолизосомы имели разрывы оболочки. Кроме того, часто встречались крупные светлые вакуоли почти без содержимого (Рис. 8, г, з), которые также нередко демонстрировали нарушение целостности оболочки.

Морфология шипиков на дендритах и структура синапсов у нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* заметно отличались от контроля. Шипики располагались на отростках более редко и иногда имели необычную т-образную форму (Рис. 9, а). Некоторые шипики имели заметно расширенное основание (Рис. 9, в-г). В синапсах везикулы имели разные размеры и форму, лежали часто беспорядочно, наблюдались также разрежения цитоплазмы (Рис. 9 б, д-е).

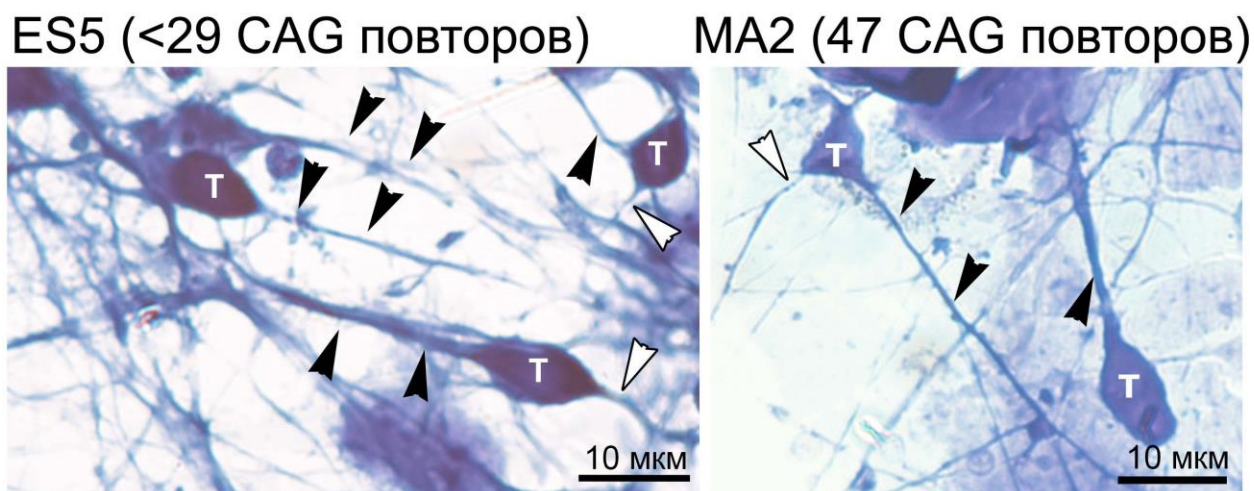


Рисунок 1. Общий вид средних шипиковых нейронов в контрольной культуре ES5 (слева) и пациент-специфичной культуре MA2 с 47 CAG повторами в гене *HTT* на полутонких срезах. т – тела нейронов; черные головки стрелок указывают на аксоны; белые головки стрелок - на дендриты. Окраска метиленовым синим.

ES5 (<29 CAG повторов) iPS12 (<29 CAG повторов)

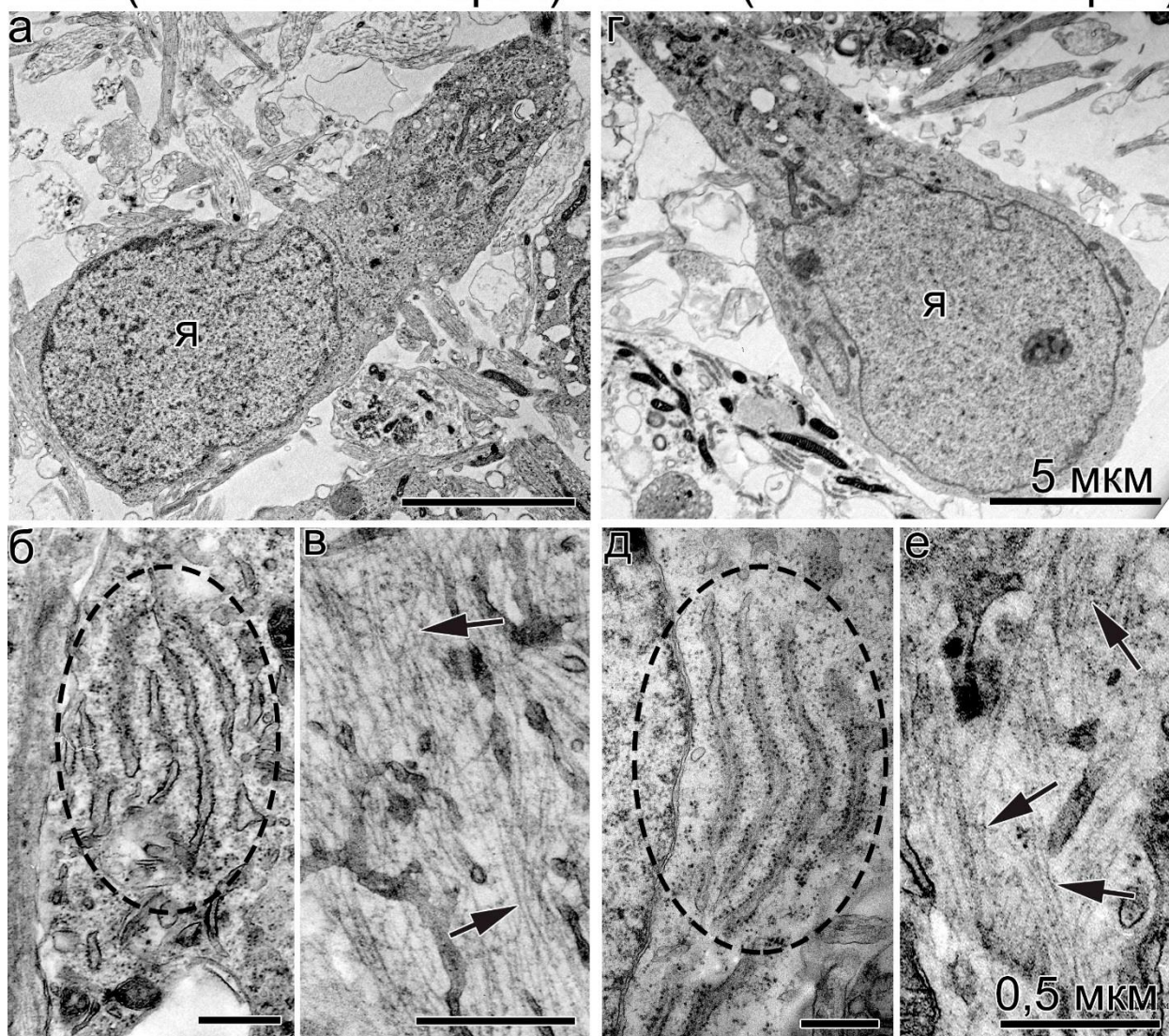


Рисунок 2. Ультраструктурная организация средних шипиковых нейронов в контрольных культурах ES5 (а-в) и iPS12 (г-е), дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток здоровых доноров.

а, г – большинство клеток имело треугольную форму, округлое ядро (Я) и обогащённую органеллами цитоплазму; б, д – тельца Ниссля (обведено пунктиром), состоящие из коротких цистерн шероховатого ЭПР; в, е – нейрофиламенты в цитоплазме (указаны черными стрелками). Масштаб: а, г – 5 мкм, б-в, д-е – 0,5 мкм.

ES5 (<29 CAG повторов)

iPS12 (<29 CAG повторов)

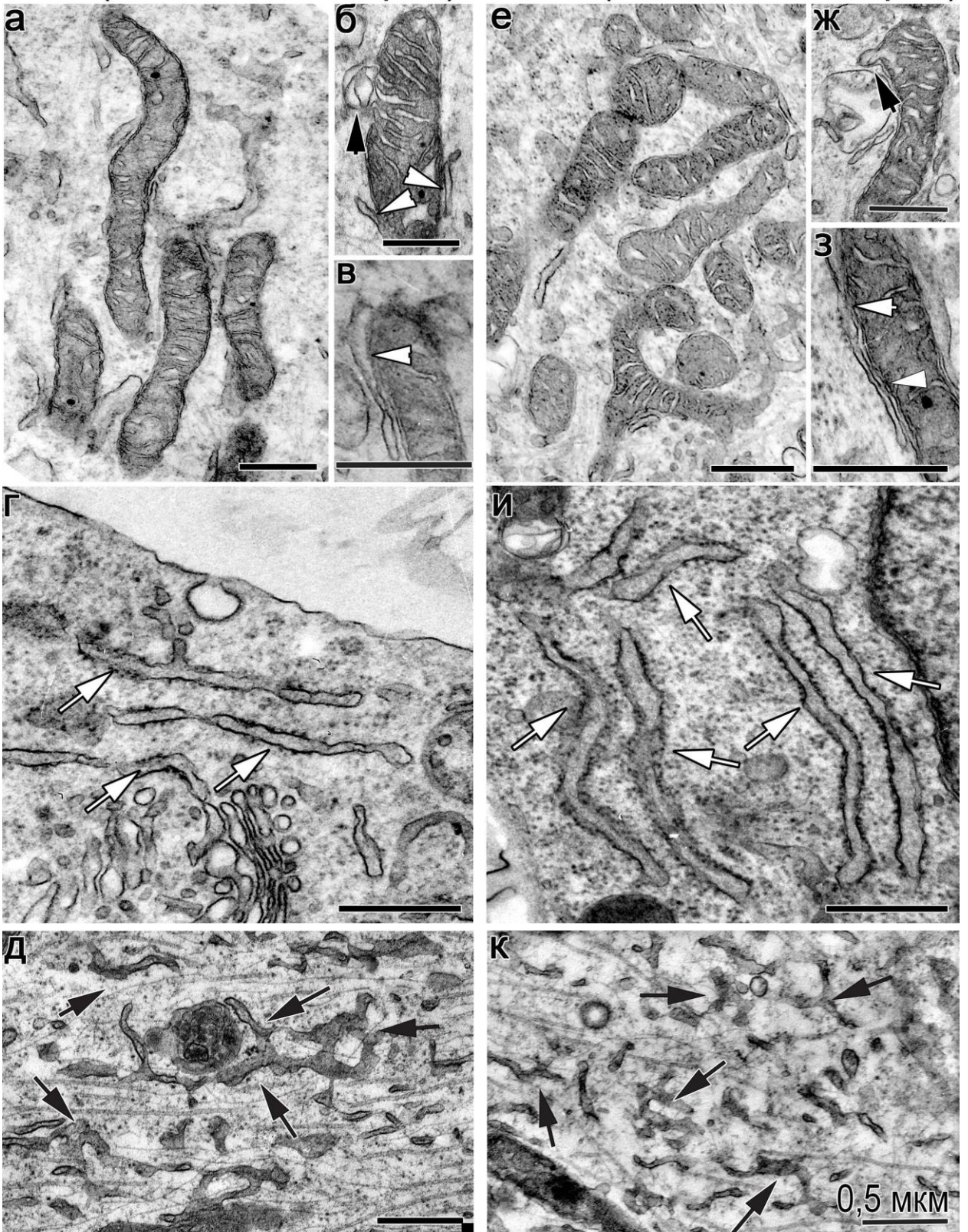


Рисунок 3. Строение митохондрий, шероховатого и гладкого ЭПР в цитоплазме средних шипиковых нейронов в контрольных культурах ES5 (а-д) и iPS12 (е-к), дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток здоровых доноров.

а, е – удлинённые митохондрии с поперечными кристами; б, ж – некоторые митохондрии имели дефекты оболочки (указано черными головками стрелок); в, з – контакт митохондрий с мембранами гладкого и шероховатого ЭПР (указано белыми головками стрелок); г, и – цистерны шероховатого ЭПР (указаны белыми стрелками); д, к – узкие цистерны гладкого ЭПР (указаны черными стрелками).

ES5 (<29 CAG повторов) iPS12 (<29 CAG повторов)

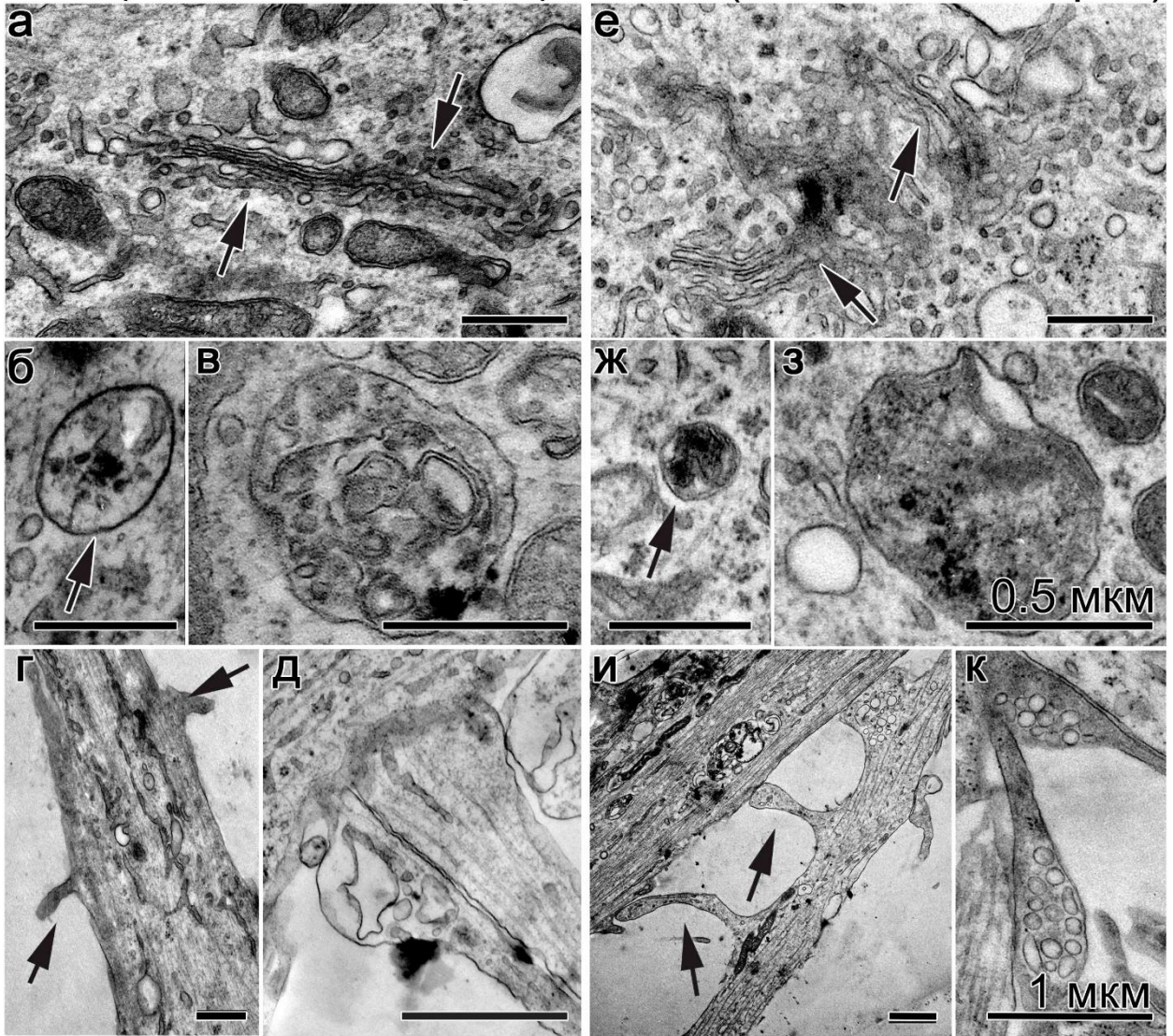


Рисунок 4. Электронно-микроскопическая характеристика средних шипиковых нейронов в контрольных культурах ES5 (а-д) и iPS12 (е-к), дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток здоровых доноров.

а, е – АГ (указан черными стрелками) представлен стопками узких диктиосом с небольшим количеством везикул; б, ж – мелкие аутолизосомы (указаны черными стрелками); в, з – крупные аутолизосомы с содержимым разной плотности; г, и – шипики на дендритах нейронов (указаны черными стрелками); д, к – синапсы, на «к» в синапсе выявляются скопления везикул разного размера. Масштаб: а-в, е-ж – 0,5 мкм, г, д, и, к – 1 мкм.

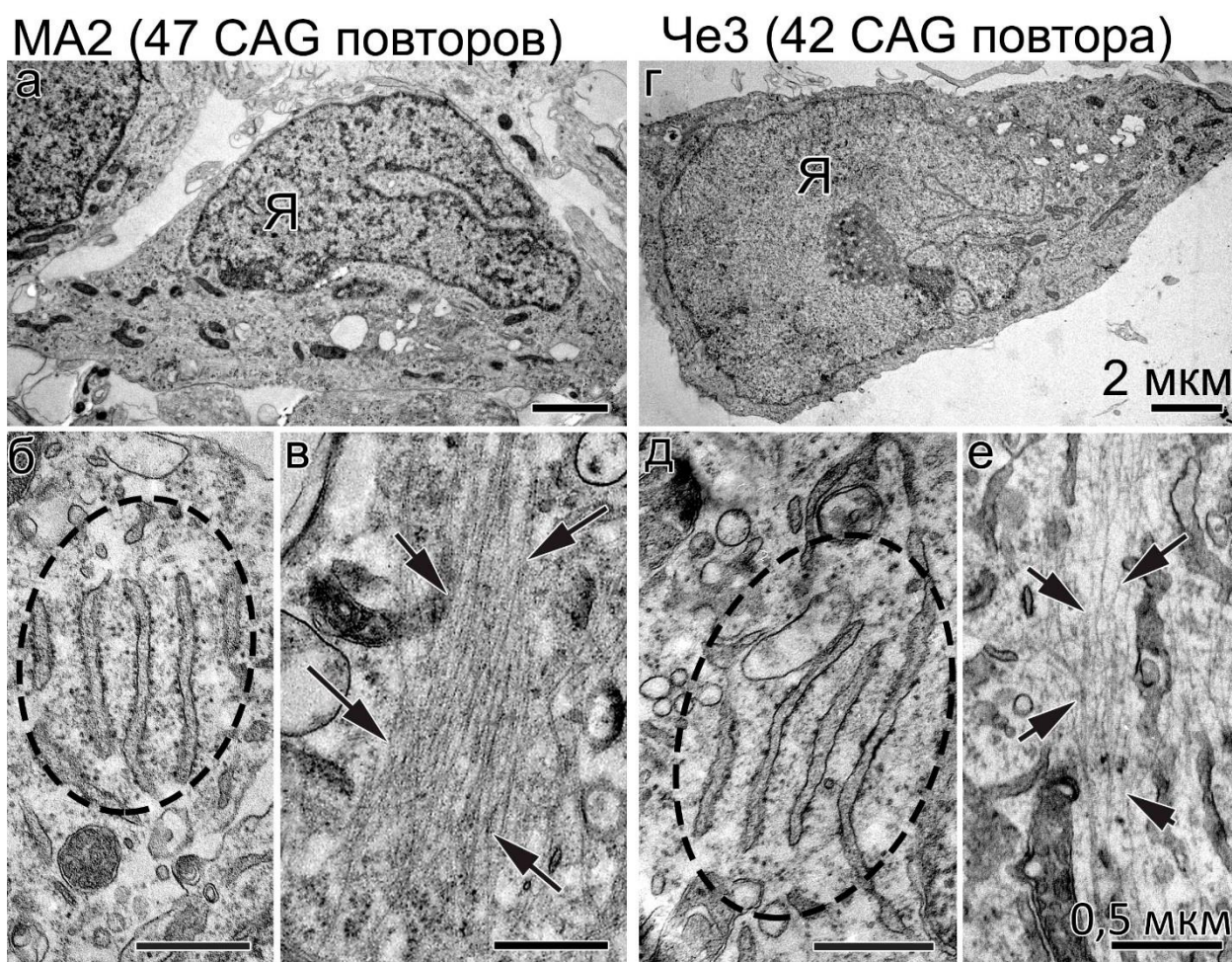


Рисунок 5. Ультраструктурная организация средних шипиковых нейронов в культурах МА2 (а-в) и Че3 (г-е), дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток пациентов с болезнью Хантингтона.

а, г – большинство клеток имело треугольную форму, ядра (Я) часто с инвагинациями оболочки; б, д – тельца Ниссля, состоящие из коротких цистерн шероховатого ЭПР (обведены пунктиром); в, е – нейрофиламенты в цитоплазме (указаны черными стрелками). Масштаб: а, г – 2 мкм, б, в, д, е – 0,5 мкм.

МА2 (47 CAG повторов)

Че3 (42 CAG повтора)

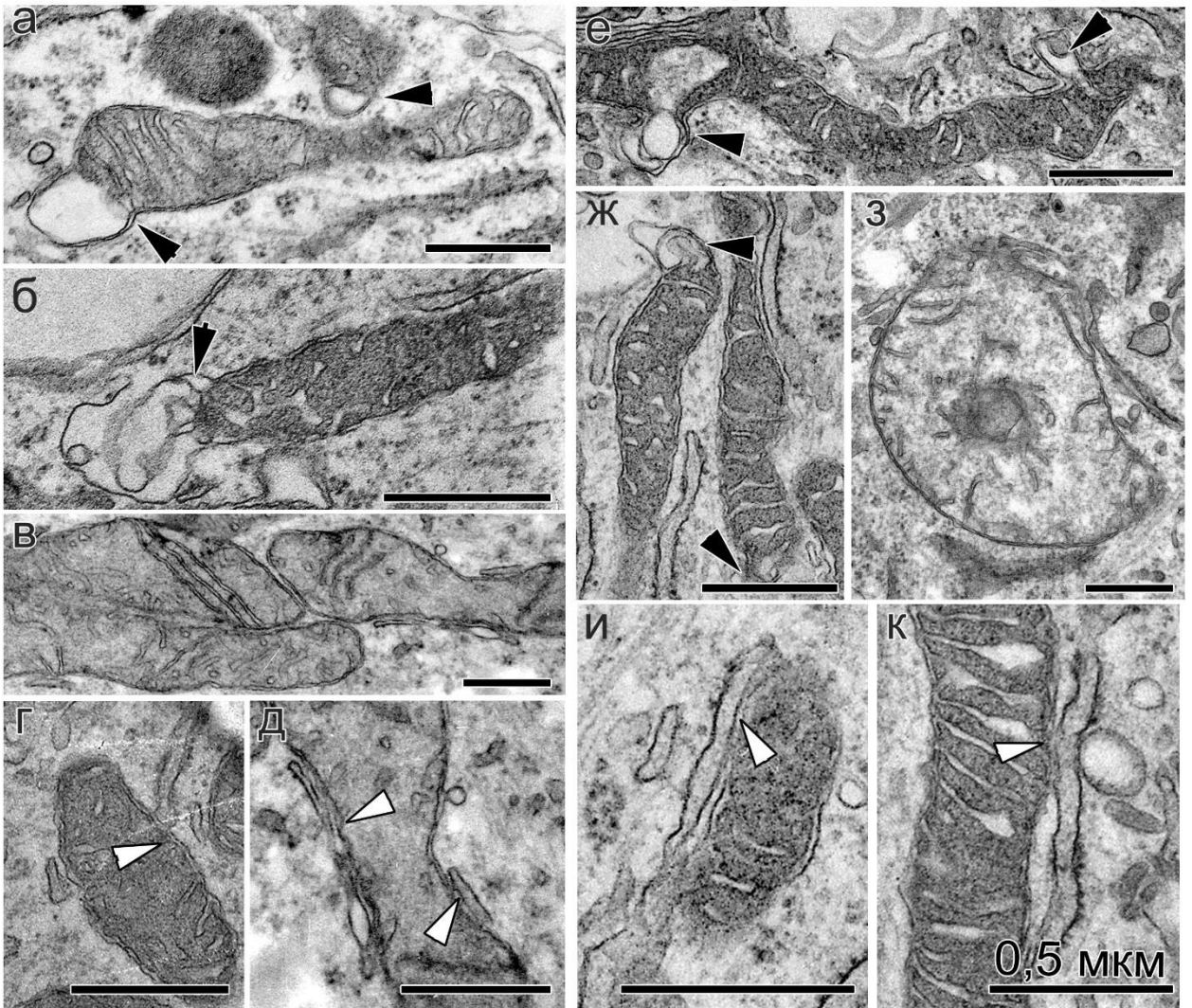


Рисунок 6. Ультраструктурные дефекты митохондрий в цитоплазме нейронов культур МА2 (а-д) и Че3 (е-к), дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток пациентов с болезнью Хантингтона.

а-б, е-ж – митохондрии с дефектами (выпячиваниями) оболочки (указаны черными головками стрелок); в, з – крупные митохондрии с нарушенным распределением крист и разрежением матрикса; г-д, и-к – контакты митохондрий с мембранами шероховатого и гладкого ЭПР (указаны белыми головками стрелок).

МА2 (47 CAG повторов)

Че3 (42 CAG повтора)

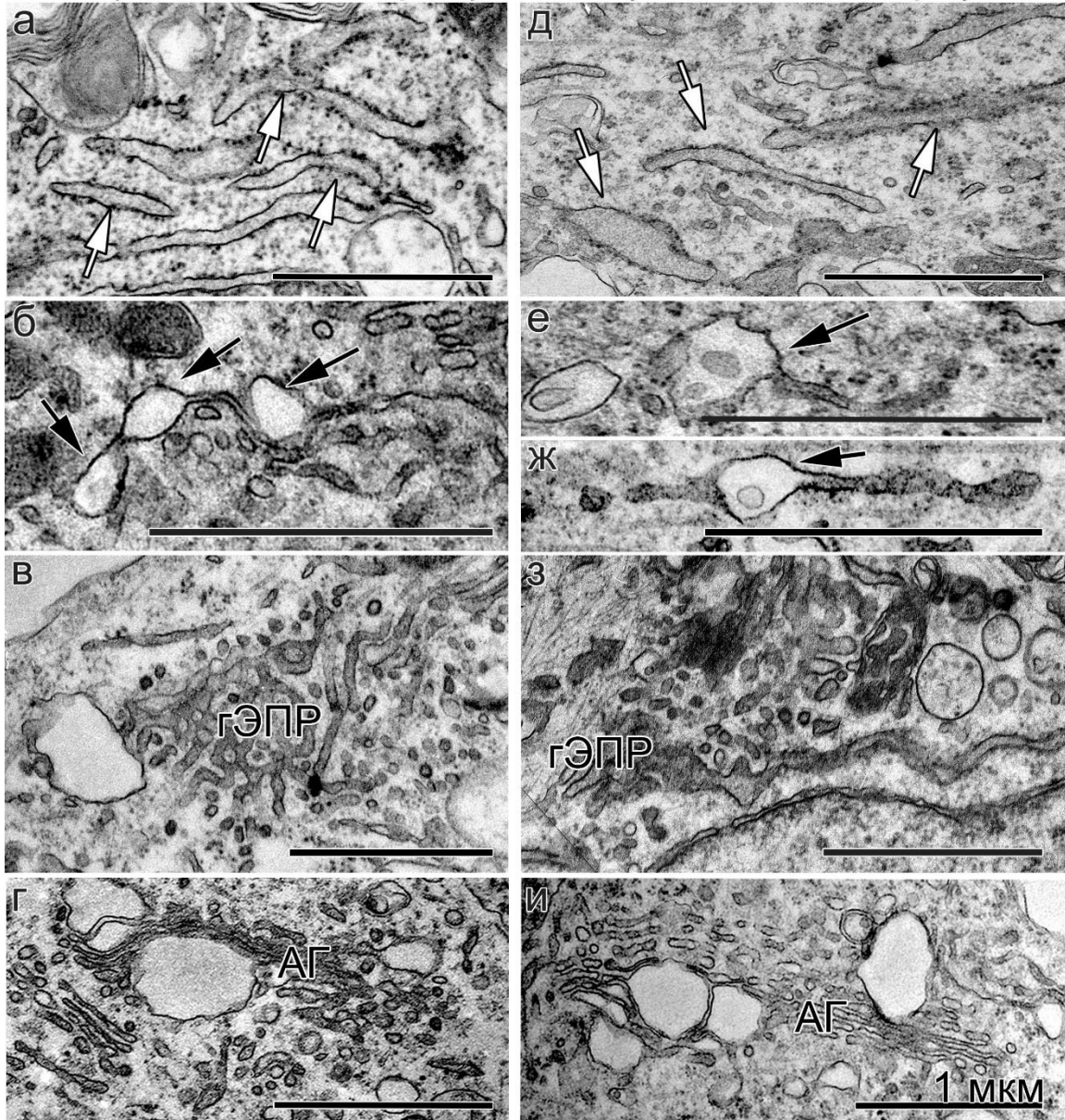


Рисунок 7. Ультраструктурный анализ организации шероховатого, гладкого ЭПР и АГ в цитоплазме нейронов культур МА2 (а-г) и Че3 (д-и), дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток пациентов с болезнью Хантингтона.

а, д – узкие и слегка расширенные цистерны шероховатого ЭПР (указаны белыми стрелками); б, е-ж – вакуолеподобные светлые расширения цистерн шероховатого и гладкого ЭПР (указаны черными стрелками); в, з – везикуляция цистерн гладкого ЭПР (гЭПР); г, и – АГ с вакуолеподобными расширениями диктиосом.

МА2 (47 CAG повторов)

Че3 (42 CAG повтора)

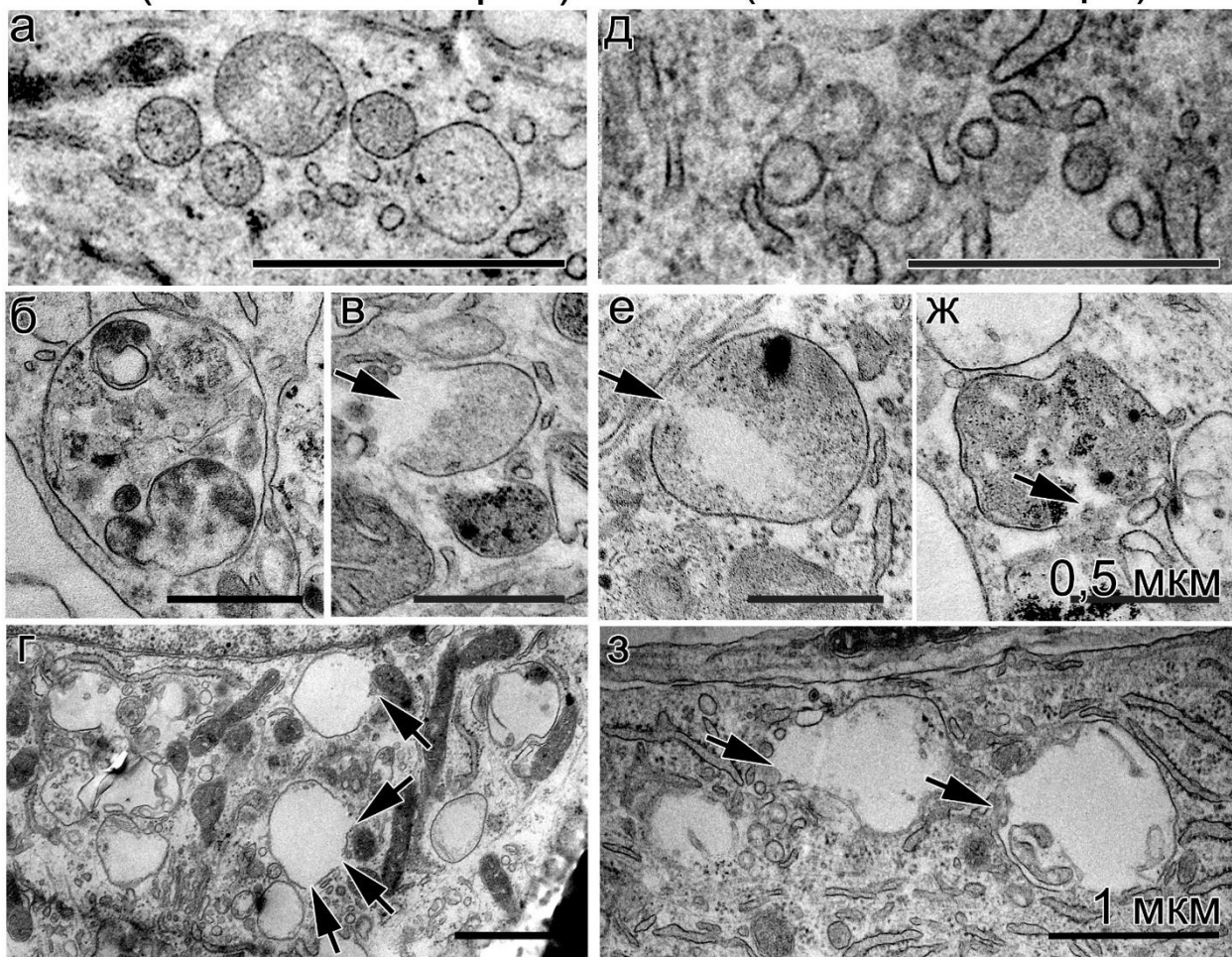


Рисунок 8. Ультраструктурный анализ аутолизосом и светлых вакуолей в цитоплазме нейронов культур МА2 (а-г) и Че3 (д-з), дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток пациентов с болезнью Хантингтона.

а, д – скопления мелких аутолизосом с гетерогенным содержимым; б, е – крупные аутолизосомы с частично переваренным содержимым разной электронной плотности; в, е-ж – аутолизосомы с разрывами оболочки (указаны черными стрелками); г, з – крупные вакуолеподобные структуры с включениями вблизи оболочки, которая часто имела нарушения целостности (указаны черными стрелками). Масштаб: а-в, д-ж – 0,5 мкм, г, з – 1 мкм.

MA2 (47 CAG повторов) Че3 (42 CAG повтора)

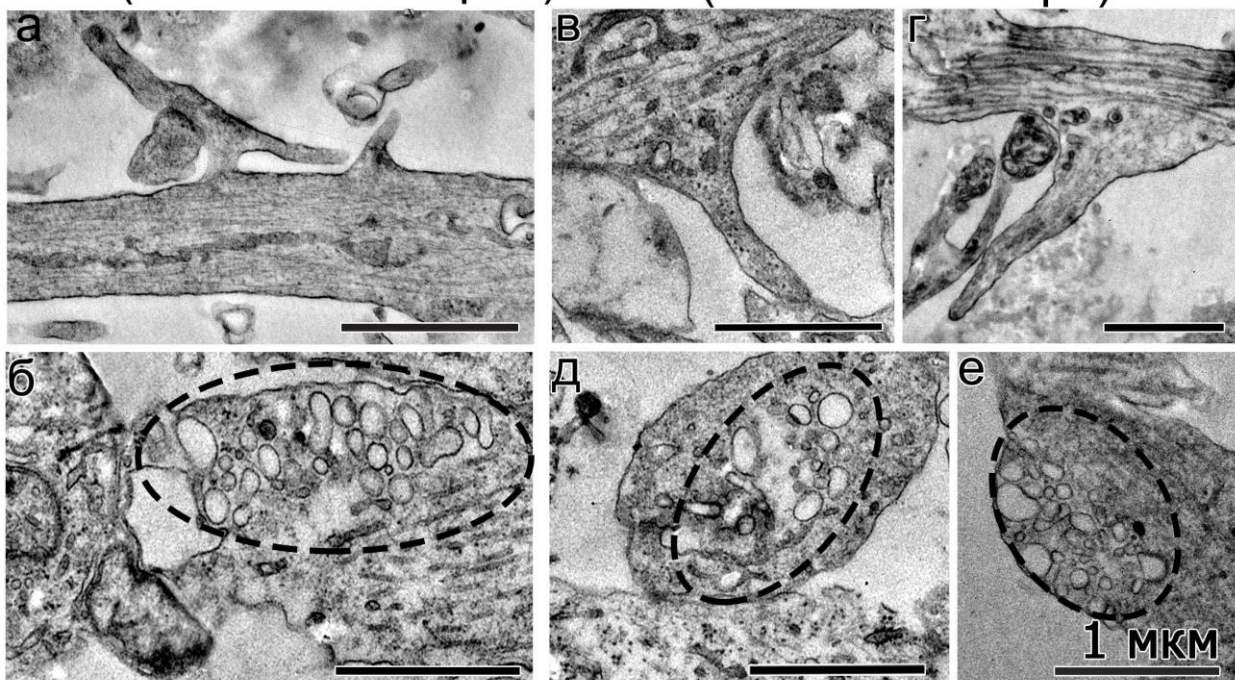


Рисунок 9. Тонкое строение шипиков и синапсов у нейронов культур MA2 (а, б) и Че3 (в-е), дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток пациентов с болезнью Хантингтона.

а, в-г – шипики с измененной формой (а) и расширенным основанием (в, г);
 б, д-е – синаптические окончания содержали различающиеся по размеру везикулы, неравномерно распределенные по площади синаптического окончания (обведены пунктиром).

3.1.2. Морфометрический анализ количества митохондрий и аутолизосом в пациент-специфичных нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*

Наиболее заметными морфологическими отличиями нейронов, полученных от пациентов с БХ и от здоровых доноров, были нарушения строения митохондрий, а также увеличение числа аутолизосом. Чтобы количественно оценить эти изменения, был проведен морфометрический анализ численности этих органелл. В обеих контрольных культурах, ES5 и iPS12, митохондрии с нарушенным строением составляли в среднем от 6% до 8% от популяции органелл в клетке (Рис. 10, а). Чаще встречались митохондрии с нарушениями строения оболочки (4 и 7%, соответственно), чем с дефектами крист и матрикса (2% и 1%, соответственно) (Рис. 10, а). В клетках с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* процент поврежденных органелл возрастал приблизительно в 3 раза (до 19% в MA2 и 22% в Че3) по сравнению со средним в контроле (Рис. 10, а). Этот рост был обусловлен увеличением доли органелл с нарушениями оболочки (до 16% в MA2 и 21% в Че3). Параллельно с этим возрастал и процент митохондрий, контактирующих с ЭПР с 24% в ES5 и 26% в iPS12 до 45% в MA2 (в 1,5 раза) и 38% в Че3 (в 1,8 раза) (Рис. 10, б). Относительное число аутолизосом в нейронах MA2 и Че3 было почти в 2 раза выше, чем в контроле (Рис. 10, в).

3.1.3. Исследование влияния ингибитора кальциевых каналов EVP4593 на морфологию пациент-специфичных нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*

Проведенный нашими соавторами транскриптомный анализ показал, что в пациент-специфичных нейронах культуры MA2 с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* изменена экспрессия генов, вовлеченных в гомеостаз кальция, а электрофизиологическое исследование показало повышенный уровень транспорта кальция в цитозоль через депо-

управляемые каналы (Nekrasov et al., 2016). Наши коллеги протестировали влияние на эти клетки ингибитора депо-управляемых кальциевых каналов EVP4593 и с использованием проточной цитометрии продемонстрировали снижение содержания лизосомальных компонентов.

Проведенный нами электронно-микроскопический анализ не выявил влияния инкубации в течение 14 часов с 1 мкМ EVP4593 на строение нейронов в контрольной культуре ES5 (Рис. 11, а-д). Удлиненные клетки имели округлые ядра (Рис. 11, а), содержали митохондрии с плотным матриксом, узкими и расширенными кристами (Рис. 11, б), а также короткие цистерны шероховатого (Рис. 11, в) и гладкого ЭПР с небольшим количеством отделяющихся от них везикул (Рис. 11, г). АГ был развит так же, как и в клетках без инкубации, и состоял из небольших стопок коротких узких диктиосом (Рис. 11, д).

В то же время, в пациент-специфичных нейронах с мутацией в гене *HTT* культуры MA2 после инкубации с EVP4593 частота патологических проявлений снижалась (Рис. 11, е-л). Реже наблюдались клетки с инвагинациями ядерной оболочки (Рис. 11, е, ж), меньшее число митохондрий имело структурные нарушения (Рис. 11, з). Гладкий и шероховатый ЭПР состояли из коротких цистерн, с небольшим количеством везикул, практически не наблюдалось расширенных цистерн (Рис. 11, и, к). АГ имел типичное строение в виде стопок коротких диктиосом (Рис. 11, л), а характерные для нейронов MA2 расширенные диктиосомы наблюдались редко и были заметно меньшего размера.

Морфометрический анализ показал, что в нейронах культуры MA2 после обработки EVP4593 происходило достоверное снижение в 1,6 раза доли митохондрий с различными нарушениями и в 2 раза митохондрий с дефектами оболочки (Рис. 12, а). Снизилось относительное число аутолизосом (в 5 раз) (Рис. 12, б). Таким образом, продемонстрировано, что нарушение тока кальция в нейронах негативно влияет на организацию

внутриклеточных структур, а его регулирование заметно улучшает морфологию клеток и таких органелл, как митохондрии и аутолизосомы.

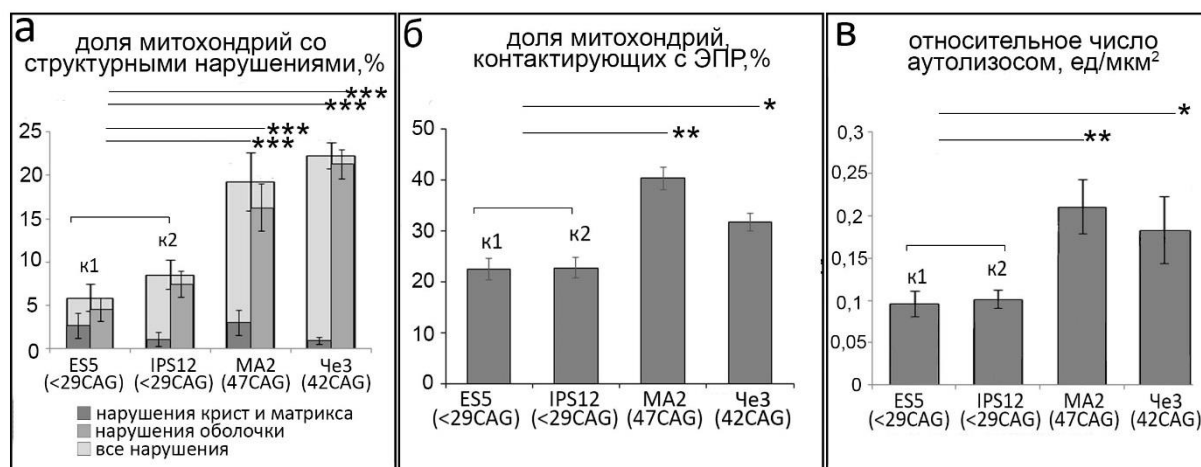


Рисунок 10. Оценка количества митохондрий с нарушенной структурой, а также контактирующих с мембранами ЭПР и аутолизосом в нейронах пациент-специфичных культур MA2 и Че3 по сравнению с нейронами контрольных культур ES5 и iPS12.

а – доля дефектных митохондрий с морфологическими нарушениями достоверно возростала в нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*; б – доля митохондрий, контактирующих с мембранами ЭПР возростала в нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*; в – относительное число аутолизосом на 1 мкм² цитоплазмы клетки возростало в нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, планка погрешности демонстрирует стандартную ошибку.

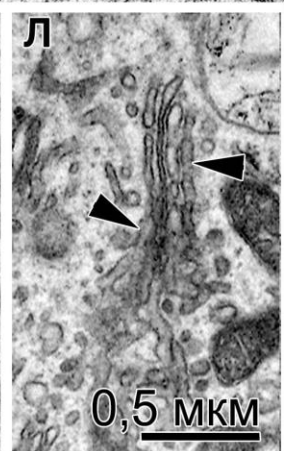
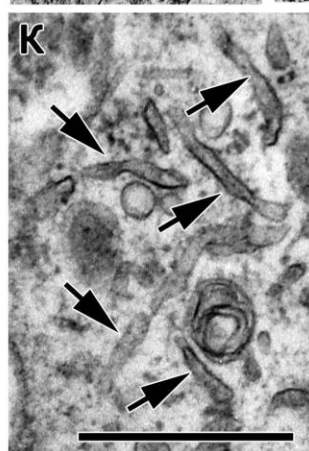
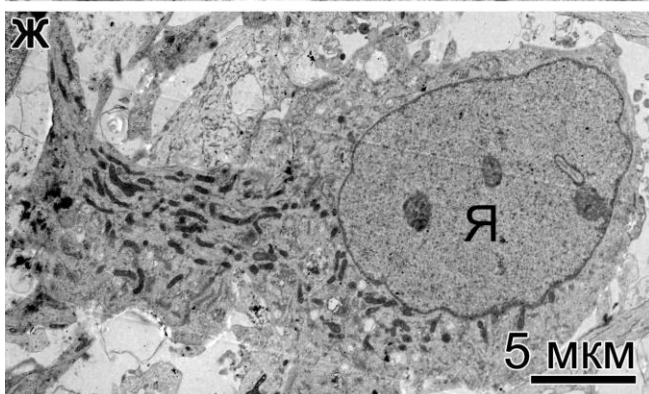
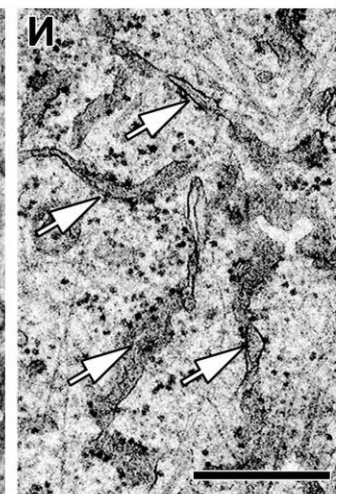
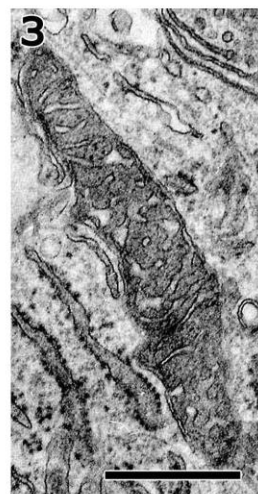
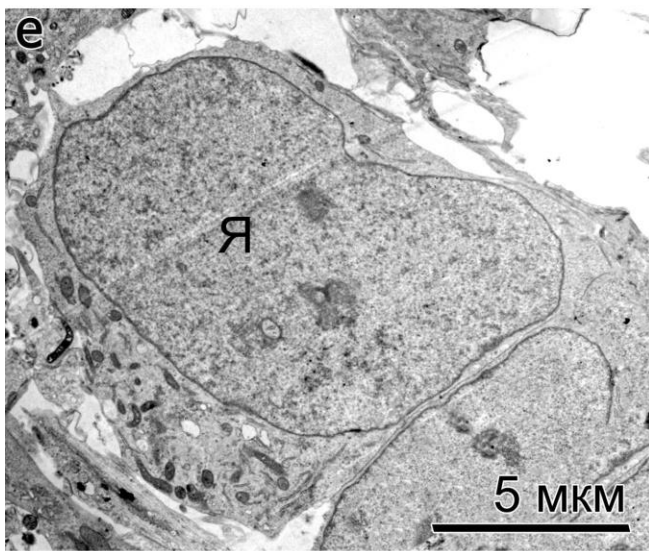
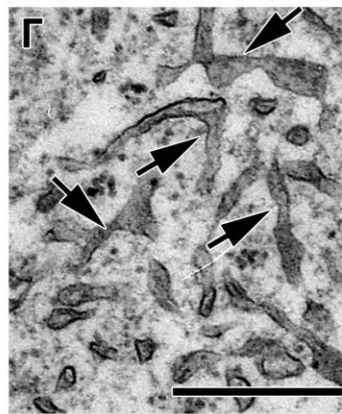
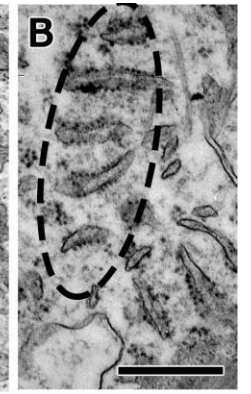
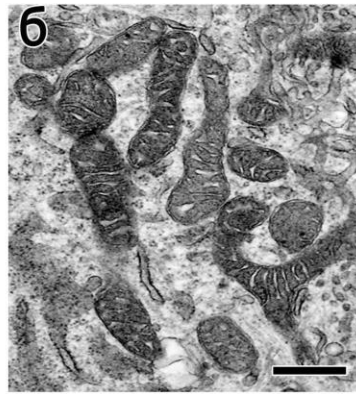


Рисунок 11. Ультраструктурная организация средних шипиковых нейронов в контрольной культуре ES5 (а-д) и пациент-специфичной культуре МА2 с 47 СAG повторами в гене *HTT* (е-л) после их инкубации с ингибитором кальциевых каналов EVP4593.

а – общий вид «здоровых» нейронов практически не изменялся под действием EVP4593; б – митохондрии с плотным матриксом и расширенными кристами; в – короткие цистерны шероховатого ЭПР (выделены пунктиром); г – короткие цистерны гладкого ЭПР (указаны черными стрелками); д – АГ, состоящий из коротких узких диктиосом с небольшим количеством пузырьков; е, ж – общий вид нейронов МА2 после инкубации с EVP4593, ядра клеток (Я) приобретали более округлую форму; з – в цитоплазме было больше митохондрий без структурных нарушений; и – цистерны шероховатого ЭПР не расширены (указаны белыми стрелками); к – цистерны гладкого ЭПР (указаны черными стрелками) формировали меньше везикул; л – диктиосомы АГ не расширены (указаны головками черных стрелок). Масштаб: а, е, ж – 5 мкм, б-д, з-л – 0,5 мкм.

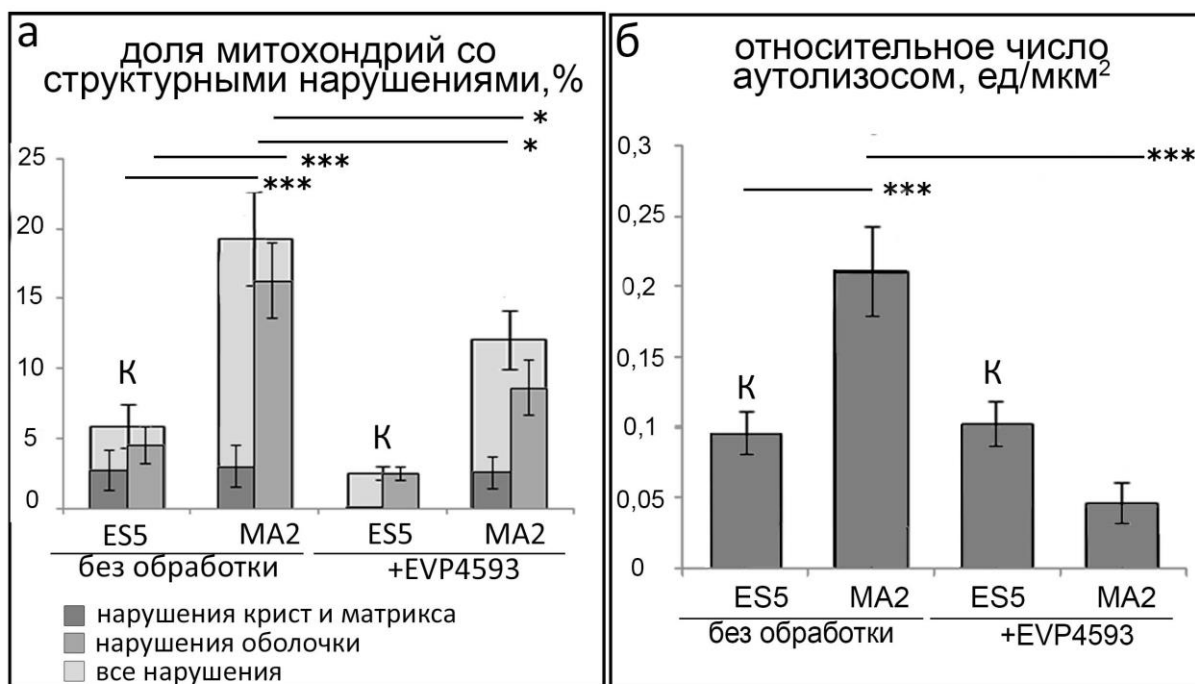


Рисунок 11. Снижение количества дефектных митохондрий и аутолизосом в пациент-специфичных нейронах культуры MA2 с 47 CAG повторами в гене *HTT* после инкубации с EVP4593.

а – процент дефектных митохондрий уменьшается в 1,6 раза при обработке EVP4593 в пациент-специфичных нейронах, тогда как в контроле уменьшается недостоверно; б – относительное число аутолизосом на 1 мкм² площади цитоплазмы уменьшается в 5 раз при обработке EVP4593 в пациент-специфичных нейронах, тогда как в контроле увеличивается недостоверно. * – $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$, планка погрешности демонстрирует стандартную ошибку.

3.2. Исследование ультраструктурной организации генетически модифицированных нейронов с увеличенным до 69 числом CAG повторов в гене *HTT*

Помимо исследований пациент-специфичных нейронов, в план нашей работы входило изучение нейронов с трансгенной встройкой дополнительных CAG повторов. Предполагалось, что наличие большого количества CAG повторов, редко встречающихся у пациентов и обуславливающих ювенильную форму заболевания, позволит выявить в этих клетках дополнительные ультраструктурные нарушения. Для электронно-микроскопического анализа были выбраны две изогенные культуры нейронов (69Q9T и 69Q25L) с 69 CAG повторами в ген *HTT* (Таблица 1). В качестве контрольных были изучены изогенные нейроны, дифференцированные из ИПСК, полученных из исходной линии фибробластов (iMA1L), а также неизогенные нейроны r2LF, дифференцированные из ИПСК, полученных из мононуклеаров крови здорового донора (Таблица 1).

3.2.2. Ультраструктурная организация контрольных и генетически модифицированных нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT*

Нейроны в контрольных культурах iMA1L и r2LF имели типичную морфологию средних шипиковых нейронов. Это были клетки треугольной или округлой формы, имевшие отростки - аксоны и дендриты (Рис. 13, а, б; Рис. 14, а, г). В цитоплазме выявлялись тельца Ниссля (Рис. 14, б, д) и нейрофиламенты (Рис. 14, в, е). Митохондрии, удлинённые с матриксом средней плотности и поперечно ориентированными кристами (Рис. 15, а, ж), были равномерно распределены в цитоплазме клеток. Изредка наблюдались эти органеллы со структурными нарушениями оболочки (Рис. 15, б, з) или контактирующие с цистернами ЭПР (Рис. 15, в, ж). ЭПР был представлен немногочисленными узкими шероховатыми (Рис. 15, г, и) и короткими гладкими цистернами (Рис. 15, д, к). АГ был умеренно развит и состоял из

стопок узких диктиосом с небольшим количеством везикул (Рис. 15, е, л). В цитоплазме присутствовали аутолизосомы различного размера, мелкие (от 0,2 до 0,6 мкм в диаметре) с содержимым средней плотности (Рис. 16, а, ж), и крупные, содержащие остатки органелл, фрагменты мембран и везикулы (Рис. 16, б-в, з-и). Шипики на дендритах были распределены на расстоянии около 6 мкм (Рис. 16, г, к-л). Кроме того, клетки в культуре формировали синапсы, везикулы в них были схожи по размеру и лежали плотно друг к другу (Рис. 16, д-е, м-н).

В популяции нейронов двух изогенных культур 69Q9T и 69Q25L с 69 CAG повторами в гене *HTT* около 70% клеток характеризовалась типичной для нейронов морфологией (Рис. 13, в, г; Рис. 17, а, д). Кроме того, наблюдались клетки с большим количеством светлых вакуолеподобных структур (около 4%) (Рис. 17, б, е) и клетки, содержащие в цитоплазме скопления крупных плотных аутолизосом и остаточных телец (около 10%) (Рис. 17, в, ж). Около 16% нейронов характеризовалась плотной цитоплазмой, аномально гипертрофированными дендритами и шипиками, а также высокой плотностью их расположения на дендритах (Рис. 17, г, з)

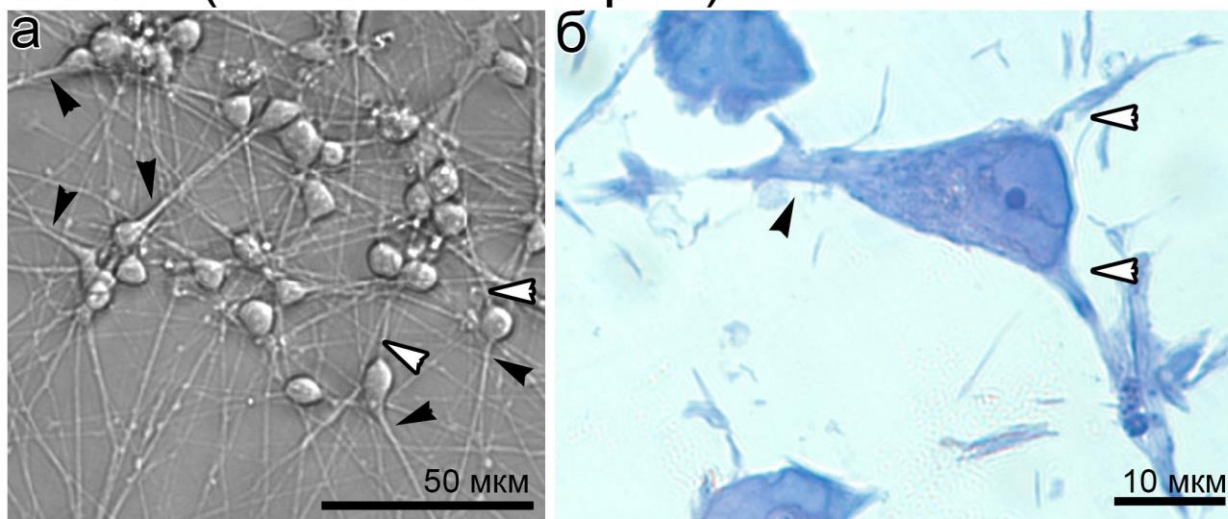
В цитоплазме нейронов с типичной морфологией, несущих встройку дополнительных повторов, митохондрии часто имели разреженный матрикс, деформированные кристы, разрывы и выпячивания оболочки (Рис. 18, а-в, е-ж). Эти органеллы часто контактировали с ЭПР на большом протяжении мембран (Рис. 18, г-д, з-и). Наблюдалась бóльшая, чем в контроле, представленность скоплений цистерн шероховатого ЭПР (Рис. 19, а, г). Вблизи мембран гладкого ЭПР и диктиосом АГ обнаруживались бóльшие, чем в контроле, скопления мелких везикул, отшнуровывающихся от цистерн и диктиосом (Рис. 19, б-в, д-е). В отличие от контрольных нейронов, в клетках с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* среди укороченных стопок АГ наблюдались отдельные расширенные диктиосомы (Рис. 19, в, е).

В цитоплазме генетически модифицированных нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* присутствовало большое

количество крупных аутолизосом, в которых наблюдались остатки органелл или гетерогенный матрикс средней плотности (Рис. 20, а, д). Также наблюдались крупные светлые вакуоли (Рис. 20, б-в, е-ж), схожие с теми, которые мы выше описали в пациент-специфичных нейронах. Они содержали остатки мембран и светлый гетерогенный матрикс, и имели, по-видимому, аутофагическое происхождение. Некоторые из них выделялись из клеток экзоцитозом (Рис. 20, б). Следует отметить частое нарушение целостности оболочки этих структур (Рис. 20, в, е). Некоторые нейроны накапливали особенно много таких светлых вакуолеподобных аутолизосом, тогда как другие содержали преимущественно плотные аутолизосомы (Рис. 20, г, з)

В то время как на дендритах большинства нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* частота расположения шипиков снижалась (Рис. 21, а, е), в культуре наблюдались нейроны, характеризующиеся гипертрофией шипиков (Рис. 21, б, ж). Они имели различные морфологические аномалии, включая раздвоение шипиков (Рис. 21, в, з) или слипание соседних шипиков (Рис. 21, д). Иногда подобные шипики имели булабовидные расширения (Рис. 21, г, з, и). Структура синапсов нейронов культур 69Q9T и 69Q25L была заметно нарушена, везикулы в них значительно варьировали по размеру и располагались разреженно (Рис. 22).

iMA1L (20 CAG повторов)



69Q9T (69 CAG повторов)

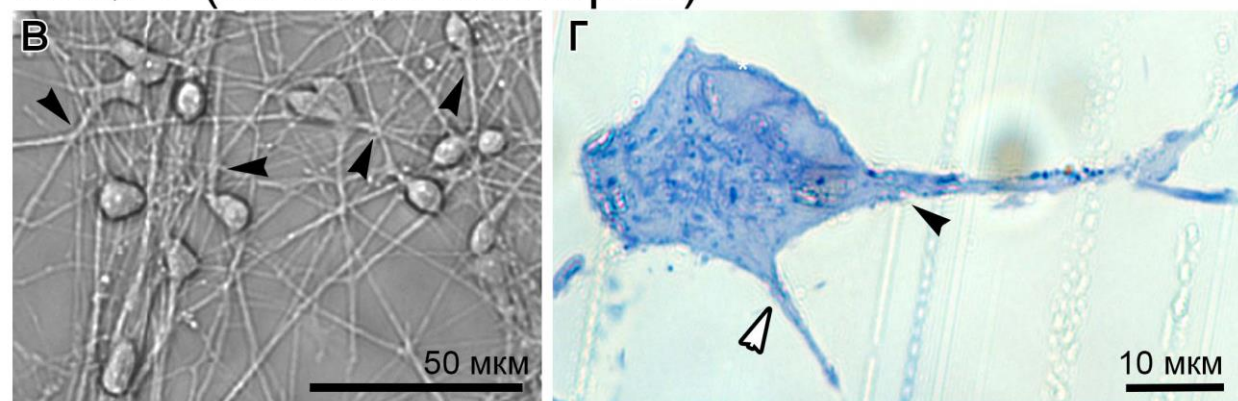


Рисунок 13. Общий вид средних шипиковых нейронов в контрольной культуре iMA1L (а, б) и в культуре генетически модифицированных нейронов 69Q9T (в, г) в световом микроскопе. а, в – фазовый контраст; г, д – полутонкие срезы, окрашенные метиленовым синим.

а – скопления нейронов контрольной культуры iMA1L в фазовом контрасте; б – нейрон в контрольной культуре iMA1L на полутонком срезе; в – скопление генетически модифицированных нейронов в культуре 69Q9T в фазовом контрасте; г – генетически модифицированный нейрон в культуре 69Q9T на полутонком срезе. Черные головки стрелок указывают на аксоны, белые головки стрелок – на дендриты. Фотографии в фазовом контрасте любезно предоставлены Е.В. Григорьевой

iMA1L (20 CAG повторов) r2Lf (22 CAG повторов)

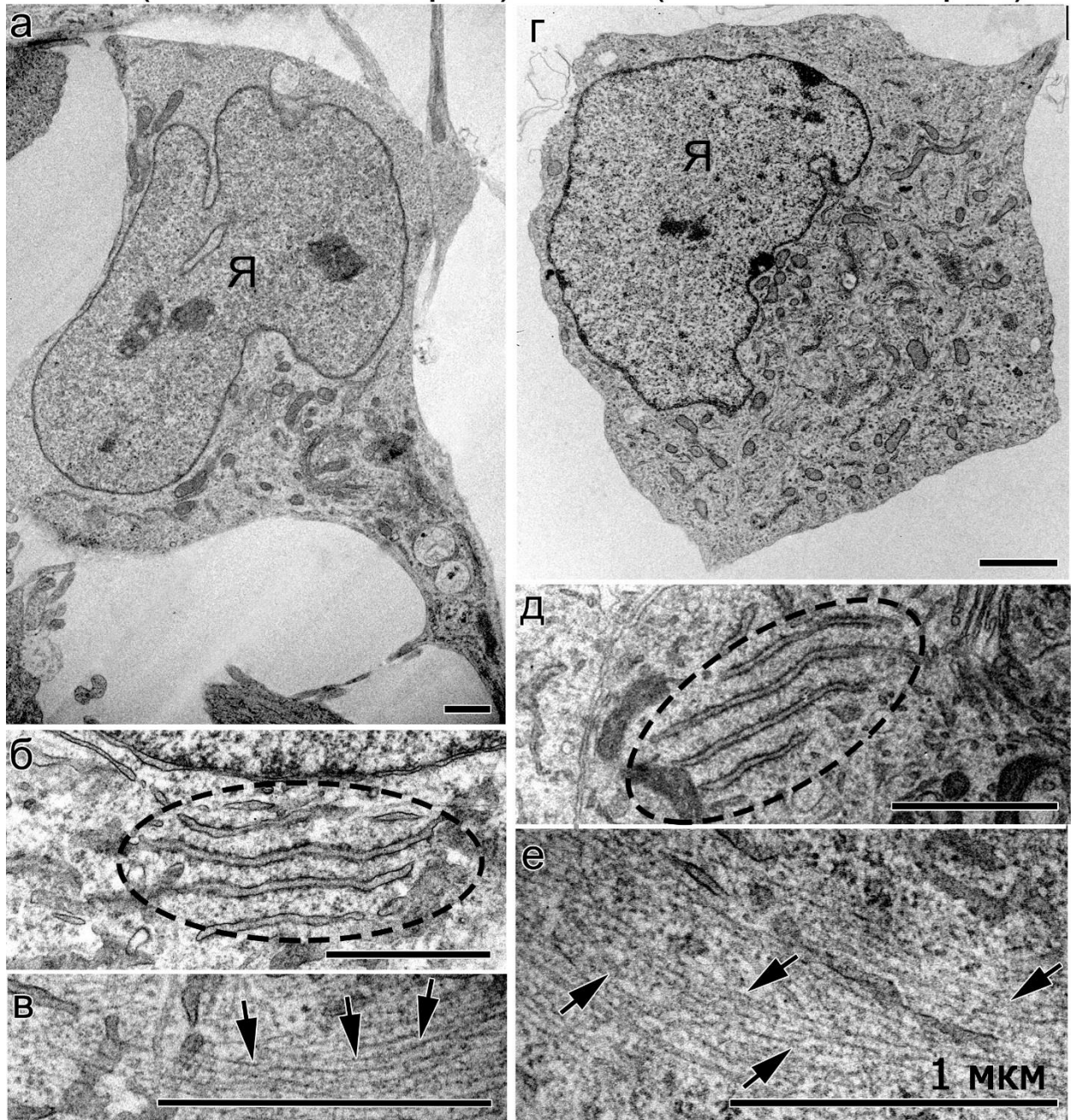


Рисунок 14. Ультраструктурная организация шипиковых нейронов в контрольных культурах iMA1 (а-в) и r2LF (г-е).

а, г – клетки с отростками и крупными ядрами (Я), иногда имевшими инвагинации оболочки; б, д – тельца Ниссля, состоящие из коротких цистерн шероховатого ЭПР (обведены пунктиром); в, е – нейрофиламенты в цитоплазме клеток (указаны стрелками).

iMA1L (20 CAG повторов) r2Lf (22 CAG повторов)

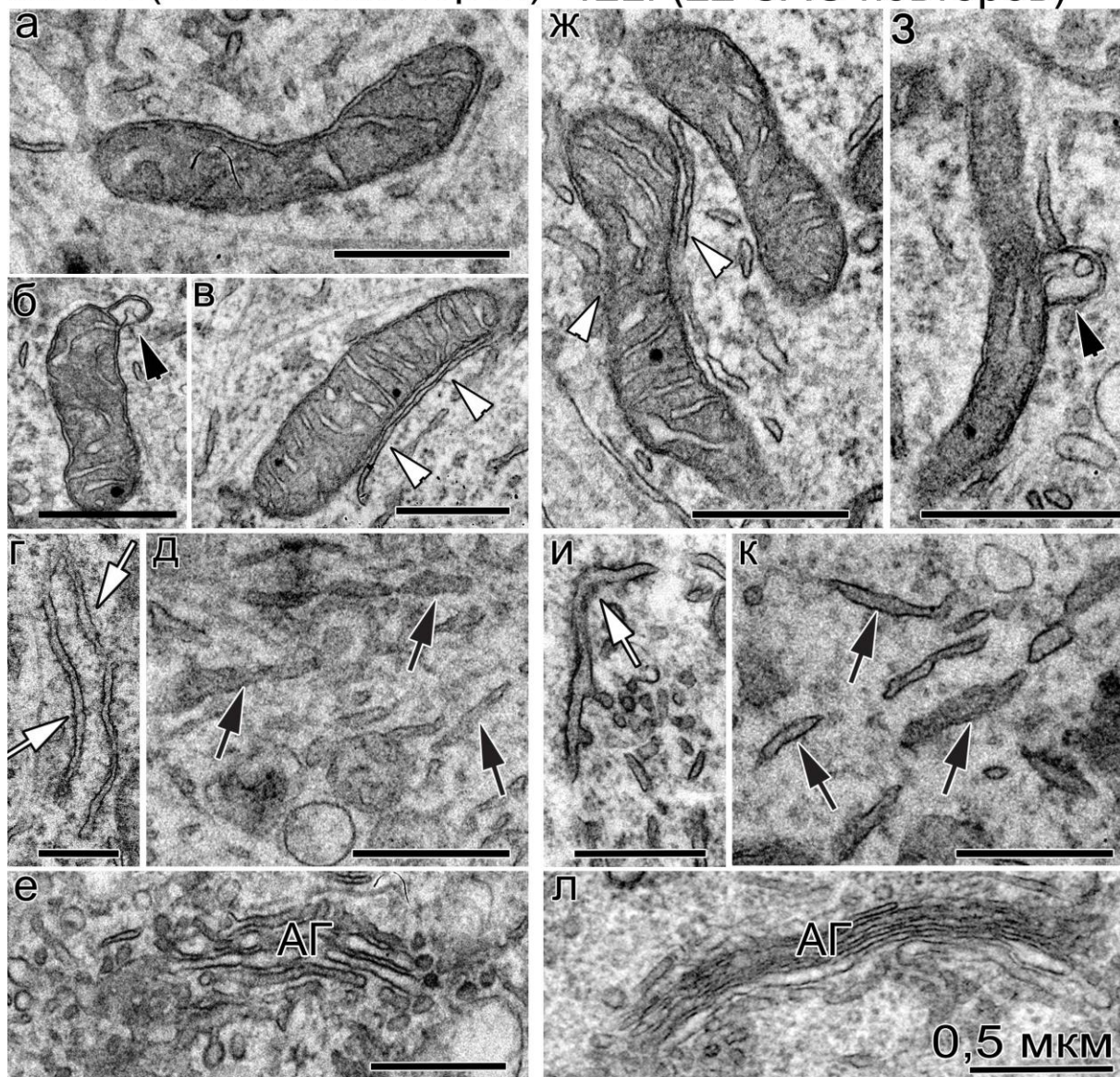


Рисунок 15. Ультраструктурная организация митохондрий, гладкого и шероховатого ЭПР, АГ в контрольных шипиковых нейронах iMA1 (а-е) и r2LF (ж-л).

а, ж – митохондрии с узкими и слегка расширенными кристами; б, з – небольшое число митохондрий с выпячиваниями оболочки (указаны черными головками стрелок); в, ж – контакт митохондрий с мембранами гладкого ЭПР (указан белыми головками стрелок); г, и – цистерны шероховатого ЭПР (указаны белыми стрелками); д, к – гладкий ЭПР представлен короткими цистернами (указаны черными стрелками); е, л – АГ представлен стопками узких диктиосом с наибольшим количеством везикул.

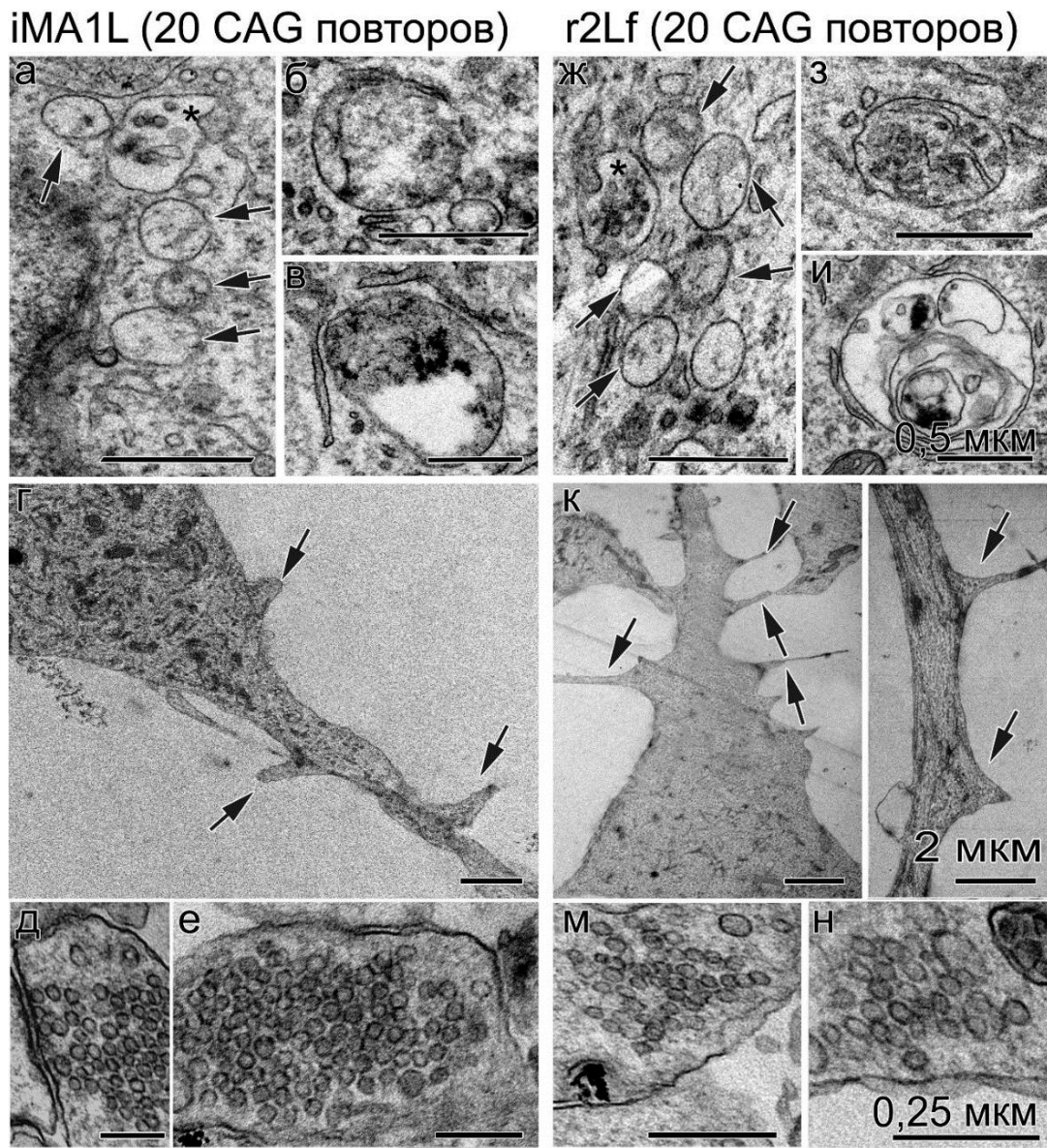


Рисунок 16. Ультраструктурная характеристика организации шипиковых нейронов контрольных культур iMA1(a-e) и r2Lf(ж-н).

а, ж – скопления мелких аутолизосом размером до 0,6 мкм с гетерогенным содержимым (указаны черными стрелками, * отмечает мультивезикулярное тело); б-в, з-и – крупные аутолизосомы с частично переваренным материалом разной электронной плотности; г, к-л – шипики на дендритах нейронов (указаны черными стрелками); д-е, м-н – синапсы, содержащие скопления мелких везикул вблизи пресинаптической мембраны. Масштаб: а-в, ж-и – 0,5 мкм; г, к-л – 2 мкм, д-е, м-н – 0,25 мкм.

69Q9T (69 CAG повторов)

69Q25L (69 CAG повторов)

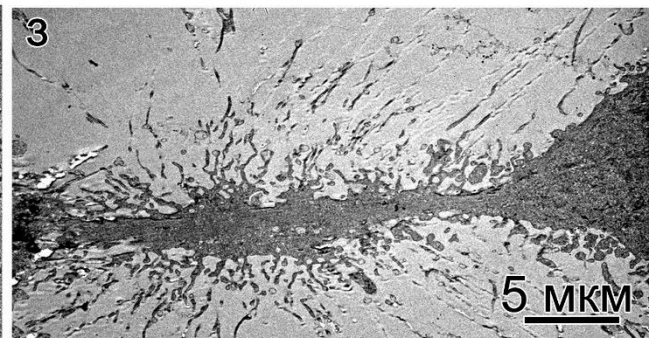
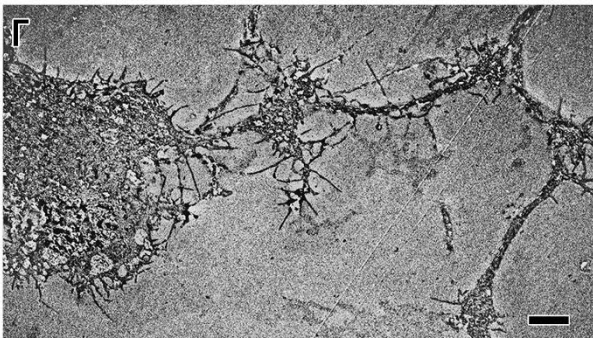
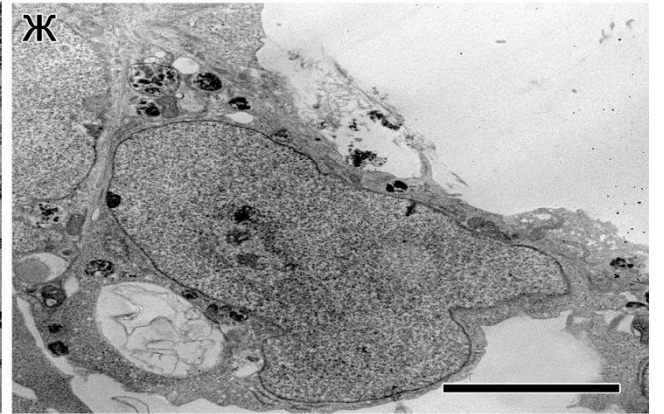
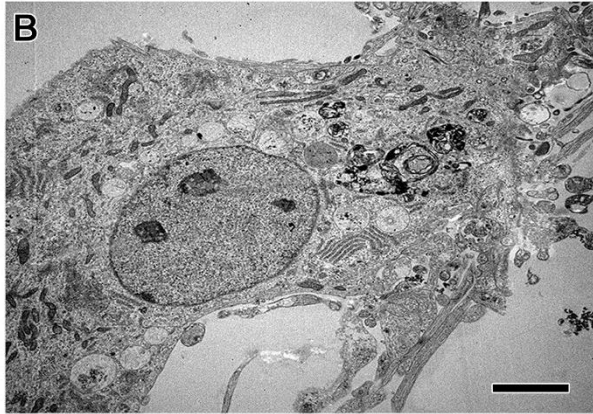
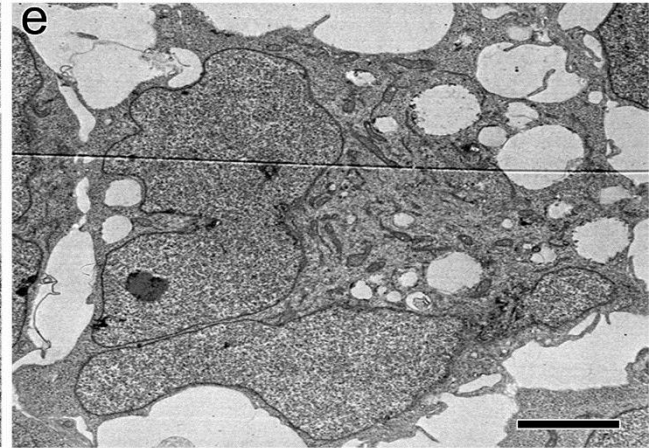
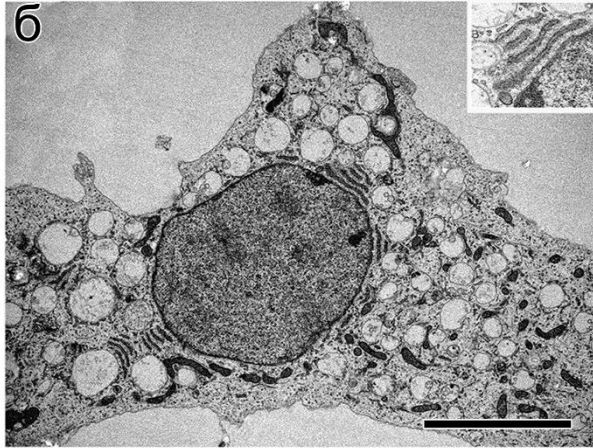
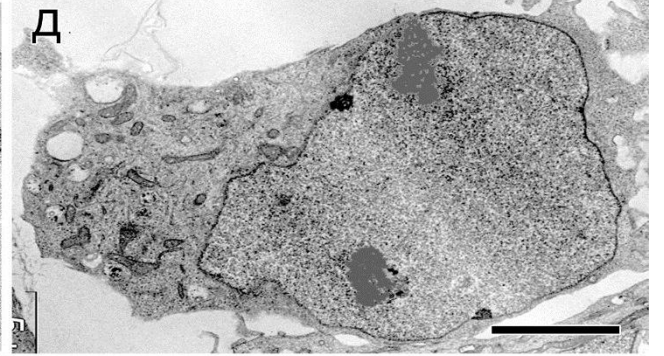
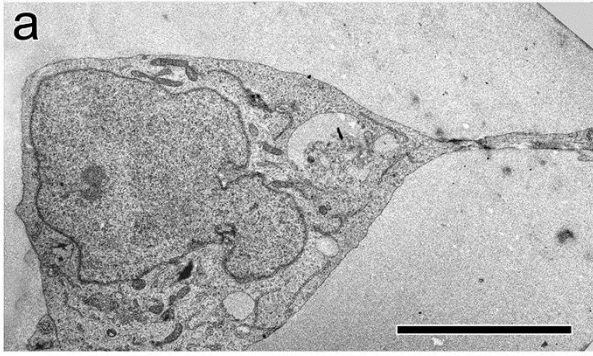


Рисунок 17. Ультраструктурная организация 4-х типов отличающихся по морфологии нейронов в культурах 69Q9T (а-г) и 69Q25L (д-з) с 69 CAG повторами в гене *HTT*.

а, д – нейроны с типичной структурной организацией; б, е – нейроны с большим количеством аутолизосом и светлых вакуолей в цитоплазме, иногда достигающих больших размеров, на вставке – тельце Ниссля; в, ж – клетки, содержавшие большое количество электронно-плотных аутолизосом в цитоплазме; г, з – фрагменты нейронов с аномальной морфологией, имеющих атипичные дендриты, множественные шипики (г) и аномальные аксоны (з).

69Q9T (69 CAG повторов) 69Q25L (69 CAG повторов)

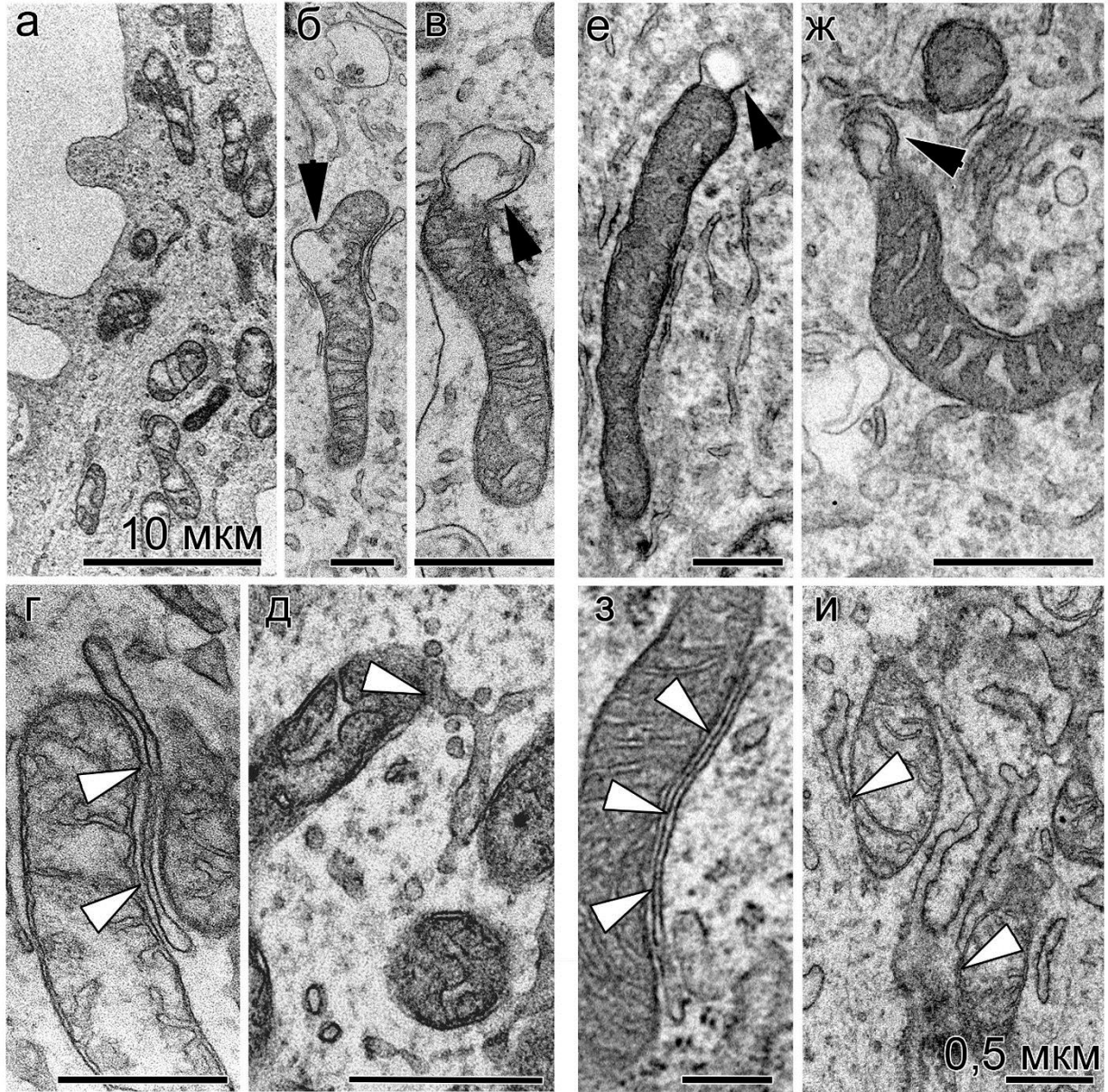


Рисунок 18. Нарушения структуры митохондрий в нейронах культур 69Q9T (а-д) и 69Q25L (е-и) с 69 CAG повторами в гене *HTT*.

а – скопление дефектных митохондрий с участками разреженного матрикса;
 б-в, е-ж – митохондрии с дефектами оболочки (черные головки стрелок); г-д,
 з-и – тесные контакты мембран ЭПР с митохондриями (белые головки
 стрелок). Масштаб: а – 10 мкм, б-и – 0,5 мкм.

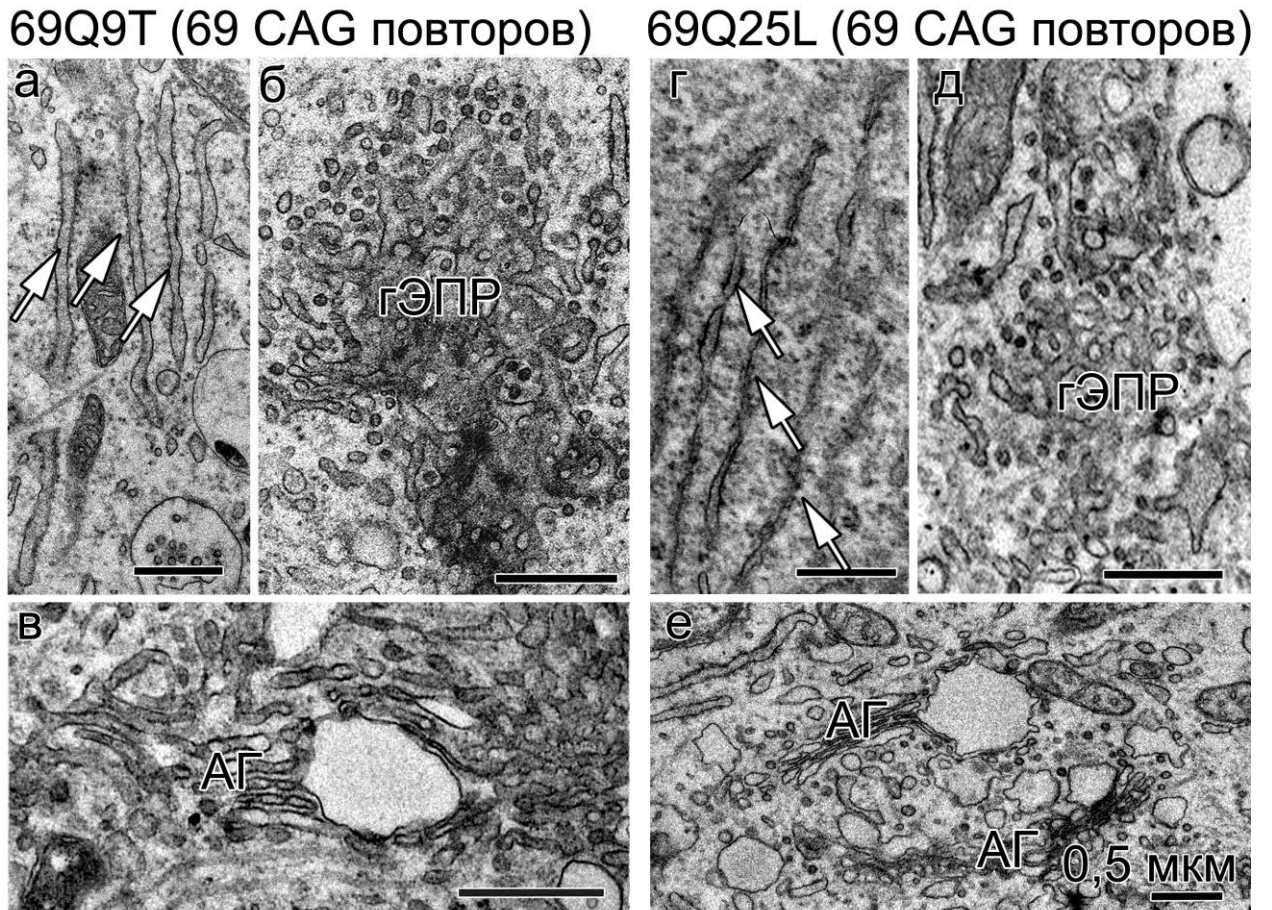


Рисунок 19. Ультраструктурная организация шероховатого, гладкого ЭПР и АГ в цитоплазме нейронов культур 69Q9T (а-в) и 69Q25L (г-е), с 69 CAG повторами в гене *HTT*.

а, г – узкие цистерны шероховатого ЭПР (указаны белыми стрелками); б, д – усиленная везикуляция мембран гладкого ЭПР (гЭПР); в, е – комплексы АГ с расширенными диктиосомами.

69Q9T (69 CAG повторов) 69Q25L (69 CAG повторов)

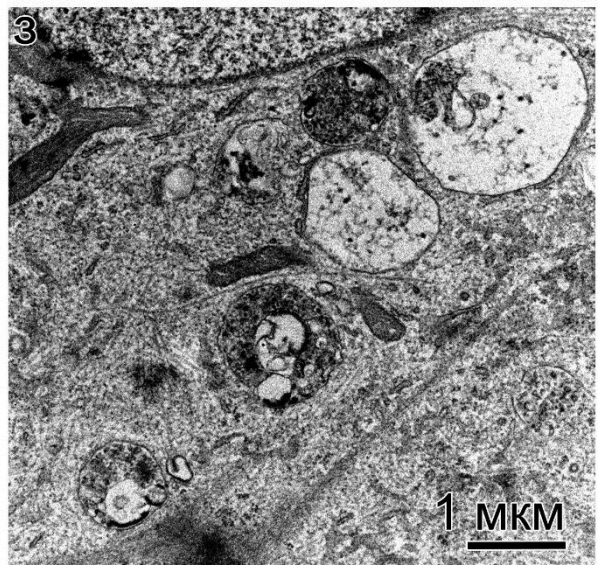
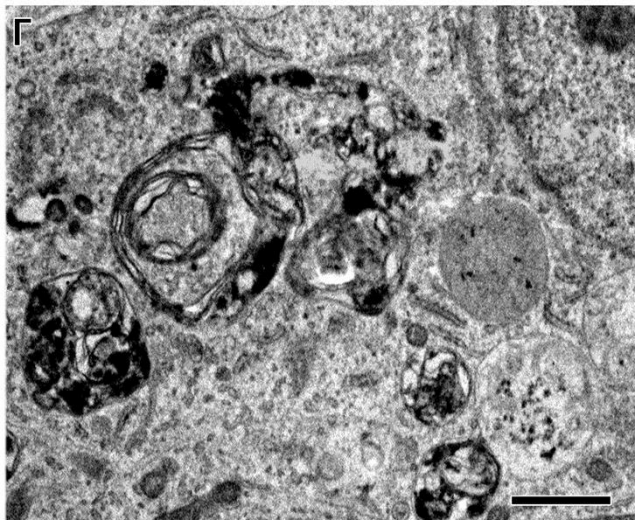
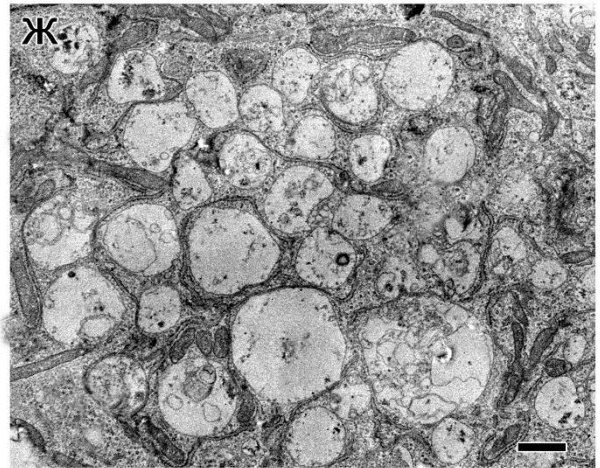
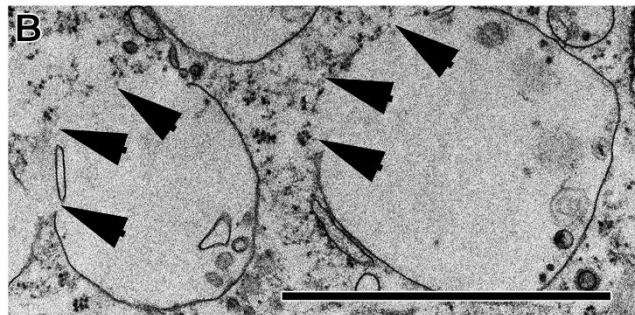
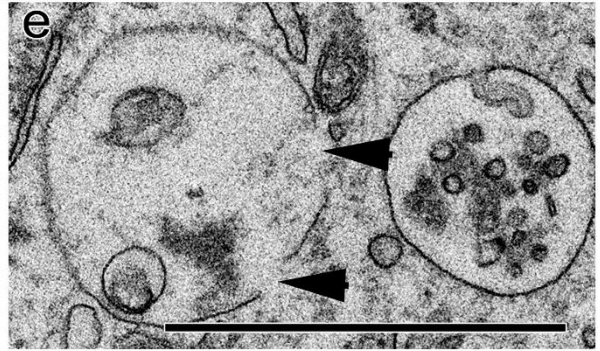
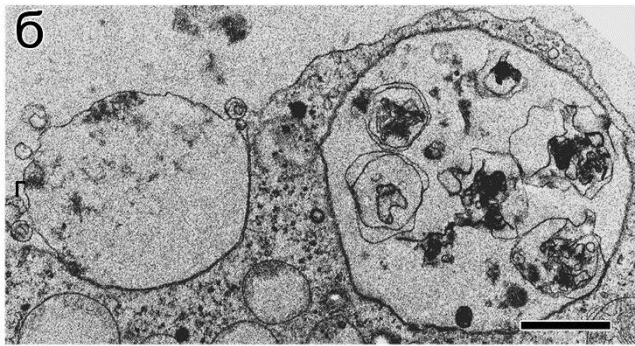
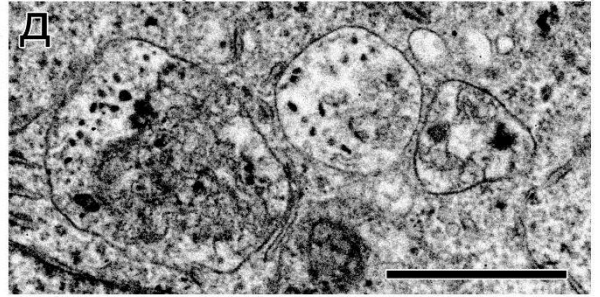
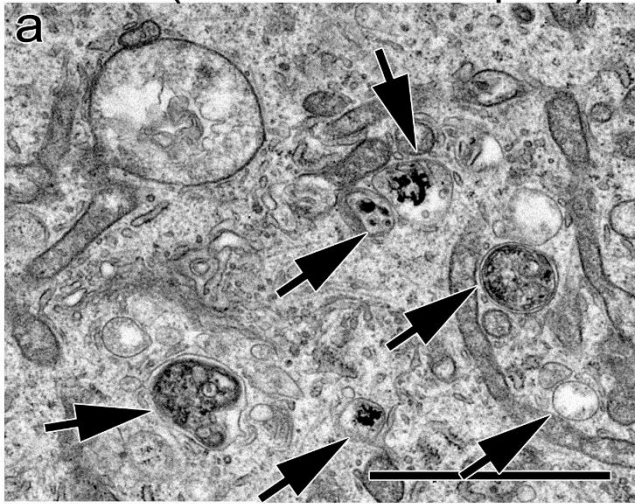


Рисунок 20. Нарушения строения аутолизосом в цитоплазме нейронов культур 69Q9T (а-г) и 69Q25L (д-з) с 69 CAG повторами в гене *HTT*.

а, д – аутолизосомы разных размеров с гетерогенным содержимым; б – выделение аутолизосомы в межклеточное пространство путем экзоцитоза; в, е – нарушение целостности оболочек светлых вакуолей (в) и аутолизосом (е) (указаны черными головками стрелок); ж – скопление аутолизосом разных размеров; г, з – скопления плотных остаточных телец и крупных аутолизосом в цитоплазме гибнущих нейронов.

69Q9T (69 CAG повторов)

69Q25L (69 CAG повторов)

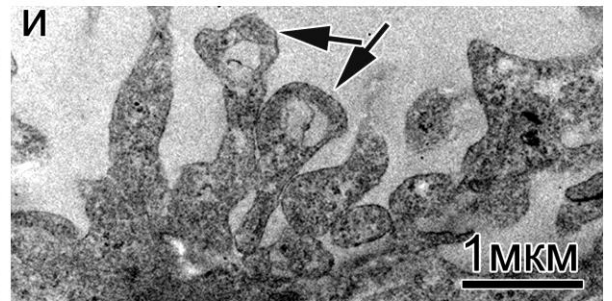
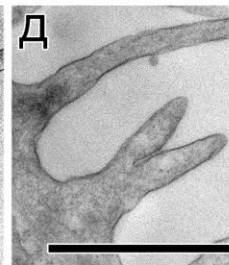
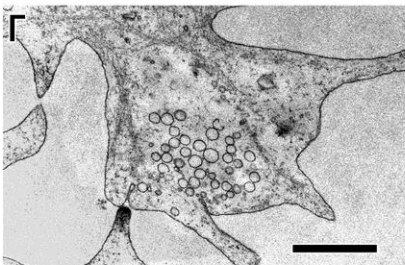
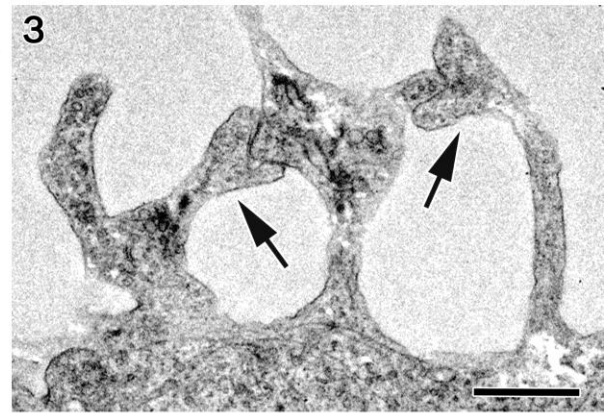
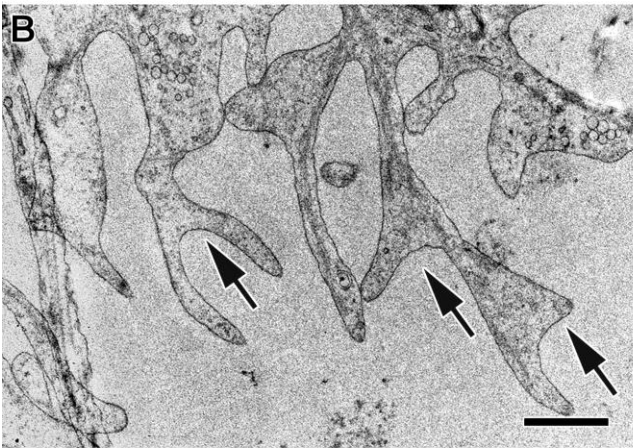
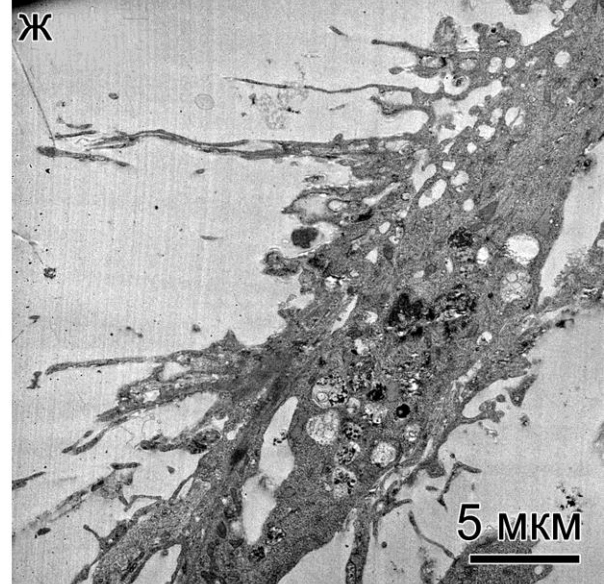
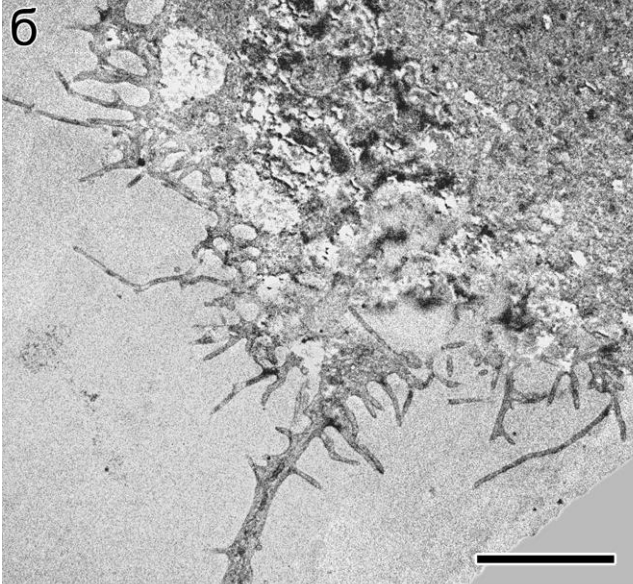
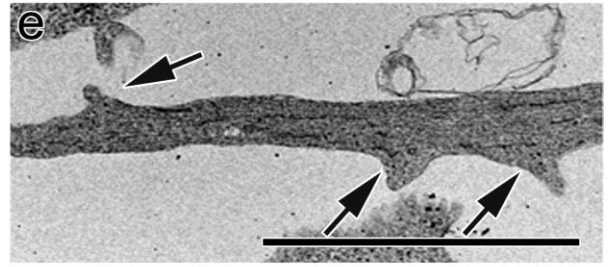
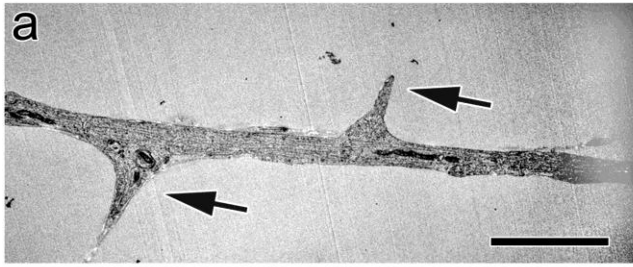


Рисунок 21. Нарушения структурной организации дендритов и шипиков нейронов культур 69Q9T (а-д) и 69Q25L (е-и) с 69 CAG повторами в гене *HTT*.

а, е – дендриты нейронов с типичной морфологией, расположение шипиков (указаны стрелками) более редкое по сравнению с контролем; б, ж – фрагмент нейрона с атипичной морфологией, имеющего множество коротких и длинных дендритов с хаотично расположенными на них шипиками; в-д, з – дефектные раздвоенные или слипшиеся шипики (указаны стрелками); и – близкорасположенные шипики с головками булавовидной формы (указаны стрелками). Масштаб: а-б, е-ж – 5 мкм, в-д, з-и – 1 мкм.

69Q9T (69 CAG повторов) 69Q25L (69 CAG повторов)

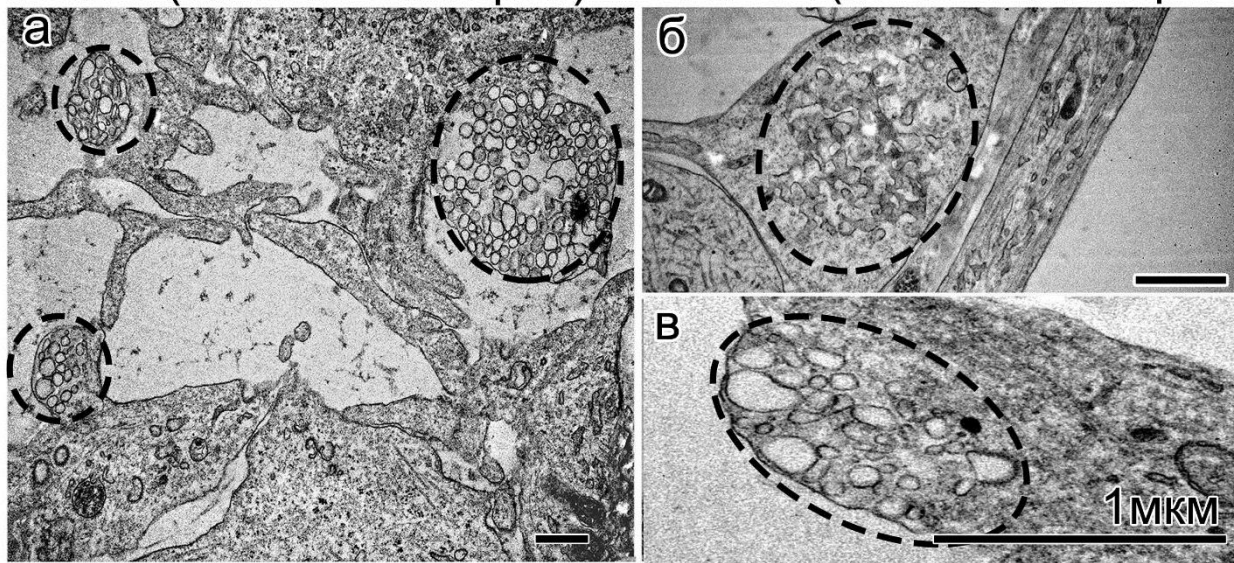


Рисунок 22. Аномальное ультраструктурное строение синаптических окончаний с нарушением организации, распределения и гетерогенностью размеров синаптических пузырьков (выделены пунктиром) у нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT*. (а, б – культура 69Q9T, в – культура 69Q25L).

3.2.3. Морфометрический анализ количественных параметров клеточных структур с нарушенной организацией в генетически модифицированных нейронах с 69 CAG повторами в гене *HTT*

Как и для пациент-специфичных нейронов, мы провели морфометрический анализ параметров органелл нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT*. Было показано, что в контрольных нейронах культур iMA1L и r2Lf процент дефектных митохондрий в клетках составлял 6,3 и 4,7%, соответственно (Рис. 23, а). В нейронах iMA1L доли митохондрий с нарушениями крист и матрикса и дефектами оболочки были приблизительно равны (2,8 и 3,4 %), тогда как в клетках r2Lf среди поврежденных митохондрий практически отсутствовали органеллы с разреженным матриксом, а нарушения целостности оболочки имели 4,4% митохондрий (Рис. 23, а). Похожее соотношение ранее было отмечено при морфометрическом анализе пациент-специфичных контрольных нейронов. В нейронах культур 69Q9T и 69Q25L с трансгенной встройкой повторов в ген *HTT* доля митохондрий со структурными нарушениями возрастала в 3 и 2,3 раза (до 16 и 12%, соответственно) по сравнению со средним значением в контроле (Рис. 23, а). Доля митохондрий с нарушениями крист и матрикса в клетках с увеличенным числом CAG повторов относительно контроля не изменялась. Процент контактирующих с ЭПР митохондрий в нейронах 69Q9T и 69Q25L с трансгенными встройками также был выше (в 1,8 раз и в 1,3 раза, соответственно), чем в среднем в контроле (Рис. 23, б). Относительное количество аутолизосом в контрольных нейронах составляло 0,11 ед/мкм² в iMA1L и 0,13 ед/мкм² в r2Lf и увеличивалось в 1,6 раза в генетически модифицированных нейронах до 0,22 ед/мкм² в 69Q9T и 0,21 ед/мкм² в 69Q25L (Рис. 23, в).

В культуре клеток с 69 CAG повторами часть нейронов характеризовалась гипертрофией шипиков. Морфометрический анализ подтвердил морфологические наблюдения. Генетически модифицированные нейроны с типичной морфологией (Рис. 24, а) имели шипики той же длины,

что и контрольные (Рис. 24, б). При этом шипики располагались на дендритах на большем расстоянии друг от друга, то есть плотность их распределения была в 1,6-1,8 раза ниже (Рис. 24, в). В то же время у «атипичных» нейронов (Рис 22, г) шипики в среднем были вдвое длиннее, чем в контроле, и чем у нейронов той же самой культуры с типичной морфологией (Рис. 24, д), и располагались с вдвое большей плотностью (Рис. 24, е).

Морфологический анализ генетически модифицированных нейронов продемонстрировал также нарушения строения синапсов – разрежение везикул и их гетерогенность по размеру (Рис. 22). Морфометрический анализ подтвердил эти наблюдения и показал, что количество синаптических везикул в нейронах 69Q9T и 69Q25L на единицу площади синапса на срезе в 3 и 5 раз меньше, чем в контрольных нейронах iMA1L и r2Lf (Рис. 25, а). Это свидетельствует о том, что синаптические везикулы действительно лежат более разрозненно и их плотность уменьшена. В нейронах с увеличенным числом CAG повторов большинство синаптических везикул крупнее, чем в контрольных: медианные значения в 0,049 и 0,068 в нейронах культур iMA1L и r2Lf, соответственно, и 0,102 и 0,108 в нейронах 69Q9T и 69Q25L, соответственно (Рис. 25, б). Кроме того, максимальный и минимальный размер везикул у нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT* достоверно выше (в 2 раза), чем в контрольных клетках.

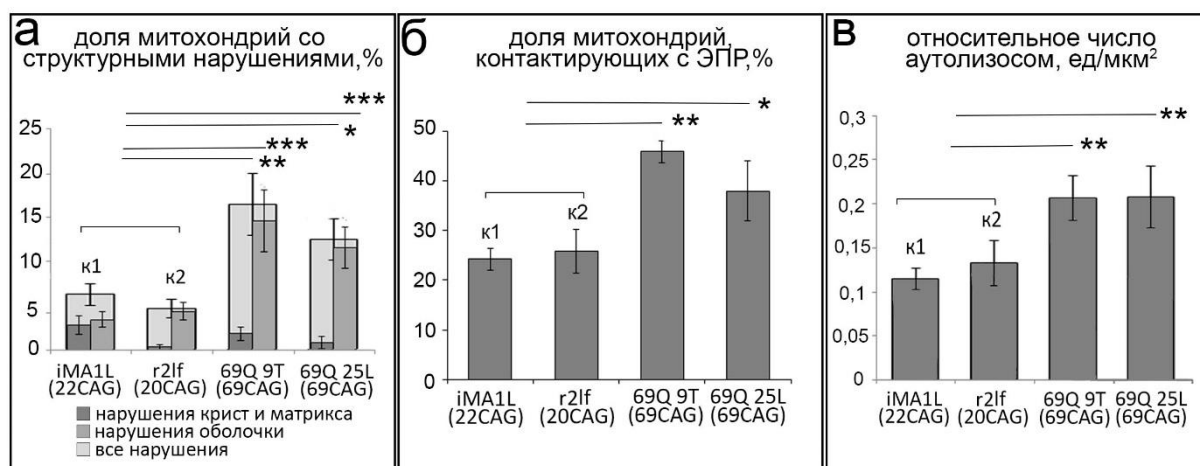


Рисунок 23. Анализ числа митохондрий с нарушенной структурой и числа аутолизосом в генетически модифицированных нейронах 69Q9T и 69Q25L с 69 CAG повторами в гене *HTT* по сравнению с контрольными нейронами (iMA1L и r2Lf), содержащими около 20 CAG повторов в гене *HTT*.

а – доля дефектных митохондрий с нарушением строения увеличена в нейронах 69Q9T и 69Q25L; б – доля митохондрий, контактирующих с мембранами ЭПР увеличена в нейронах 69Q9T и 69Q25L; в – относительное число аутолизосом на 1 мкм² цитоплазмы клетки увеличено нейронах 69Q9T и 69Q25L. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, планка погрешности демонстрирует стандартную ошибку

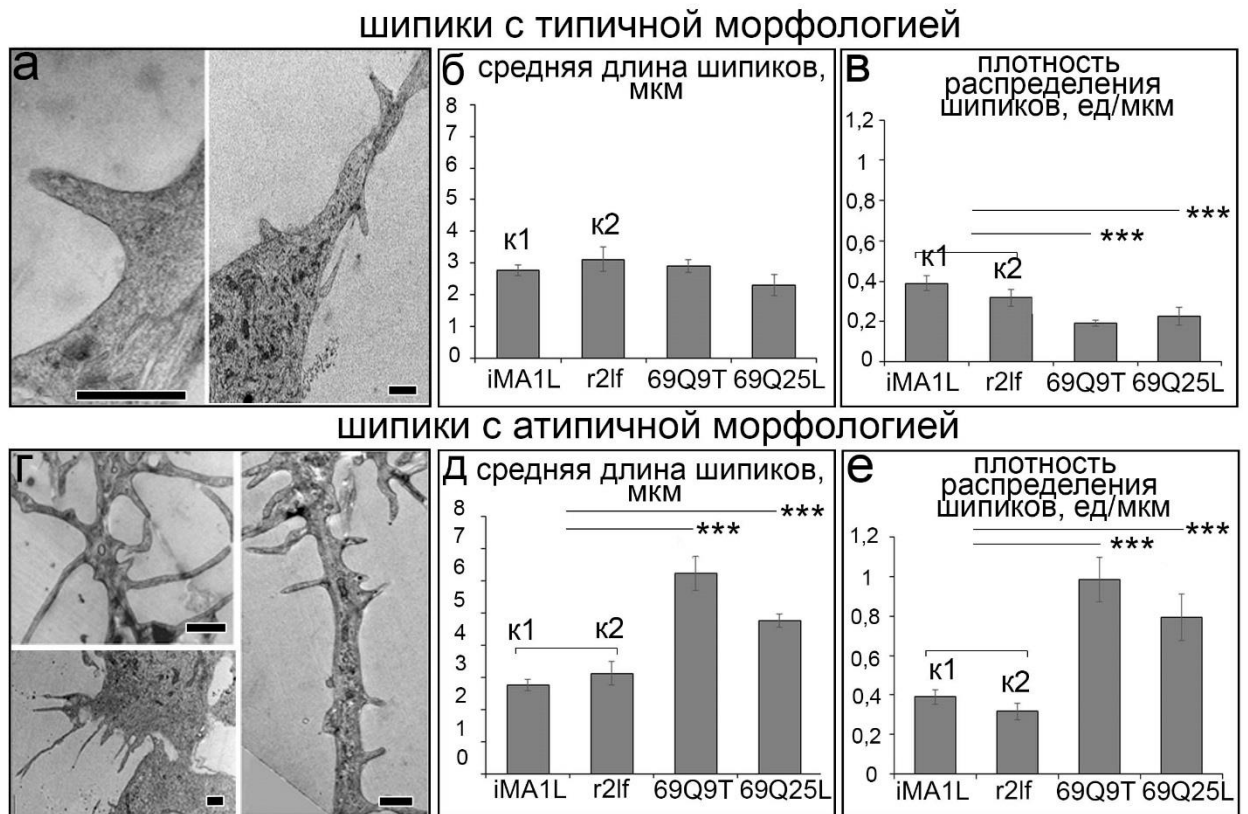


Рисунок 24. Анализ длины шипиков и плотности их распределения на дендритах с типичной морфологией (а) и атипичным строением отростков (б) в нейрональной культуре клеток. iMA1L, r2LF – контрольные клеточные культуры, несущие <22 CAG повторов; 69Q 9T и 69Q25L – генетически модифицированные клеточные культуры, несущие 69 CAG повторов в гене *HTT*.

а – типичная морфология шипиков; б – средняя длина шипиков на дендритах нейронов с 69 CAG повторами с типичной морфологией не отличалось от контроля; в – относительное число шипиков на 1 мкм длины дендрита нейрона с 69 CAG повторами с типичной морфологией достоверно снижалось; г – атипичная морфология шипиков; д – средняя длина шипиков на дендритах нейронов с 69 CAG повторами с атипичной морфологией достоверно увеличивалась; е – относительное число шипиков на 1 мкм длины дендрита нейрона с 69 CAG повторами с атипичной морфологией достоверно возрастало. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, планка погрешности демонстрирует стандартную ошибку. Масштаб: 1 мкм.

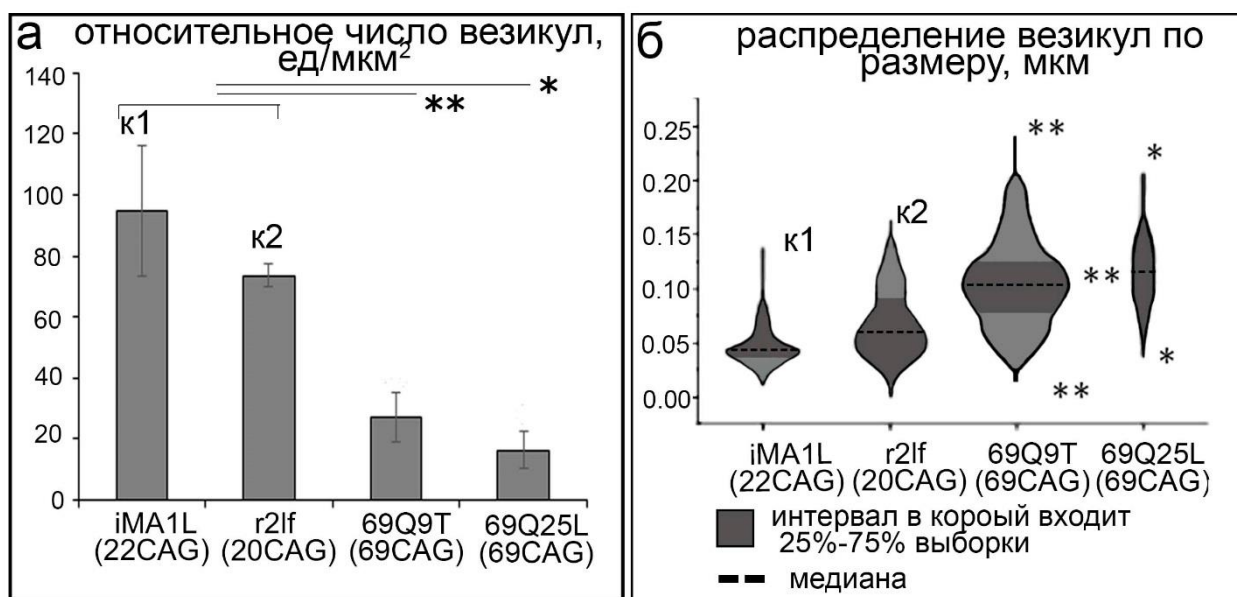


Рисунок 25. Морфометрический анализ плотности распределения и размеров синаптических везикул в генетически модифицированных нейронах 69Q9T и 69Q25L с 69 CAG повторами в гене *HTT* по сравнению с контрольными нейронами (iMA1L и r2Lf).

а – относительное число везикул на единицу площади синаптического окончания снижено в клетках с 69 CAG повторами в гене *HTT*; б – гистограммы по типу пчелиного роя (beeswarm plot), демонстрирующие распределение синаптических везикул по размеру. Высота гистограммы демонстрирует разброс значений от самых мелких до самых крупных, а их ширина зависит от количества значений того или иного размера в выборке, самое широкое место на гистограмме соответствует наибольшему количеству везикул данного размера. *– $p < 0,05$, **– $p < 0,01$, ***– $p < 0,001$, планка погрешности демонстрирует стандартную ошибку.

3.3. Исследование ультраструктурной организации клеток НЕК293 с увеличенным числом (100-150) CAG повторов в гене *HTT*

Целью нашего исследования был сравнительный анализ нарушений в клетках с разным числом CAG повторов в гене *HTT*, поэтому одной из поставленных задач являлось электронно-микроскопическое изучение нарушений в клетках с большим числом этих повторов. К сожалению, получить нейроны с таким количеством CAG повторов в гене *HTT* нашим коллегам не удалось, однако эта возможность была ими реализована на клетках НЕК293 (Human Embryonic Kidney 293), лабораторной клеточной линии, полученной из эмбриональной почки человека. На основе двух линий, НЕК293 Phoenix и НЕК293 FT, имевших менее 30 CAG повторов в гене *HTT*, нашими коллегами были получены клоны 6H и F1, соответственно, несущие 100-150 CAG повторов в гене *HTT* (Таблица 1).

3.3.1. Сравнение ультраструктурной организации исходных и генетически модифицированных клеток линии НЕК293 Phoenix, несущих 100-150 CAG повторов в гене *HTT*

Клетки НЕК293 Phoenix исходной линии имели овальную форму, крупные ядра с электронно-плотными ядрышками (Рис. 26, а). Митохондрии располагались в цитоплазме разрозненно или группами. Часть органелл имело светлый матрикс и узкие поперечно ориентированные кристы (Рис. 26, б), другие - плотный матрикс и расширенные кристы (Рис. 26, в). Некоторые митохондрии контактировали с цистернами ЭПР (Рис. 26, в). Шероховатый и гладкий ЭПР состоял из коротких цистерн с небольшим количеством расположенных вблизи везикул (Рис. 26, г, д). В цитоплазме наблюдалось также небольшое количество окончатых мембран (Рис. 26, е). Развитый АГ был представлен стопками диктиосом и везикул разного размера (Рис. 26, ж). Небольшие аутолизосомы (до 0,6 мкм в диаметре) имели гетерогенное или плотное содержимое (Рис. 26, з, и), были немногочисленны и располагались по всей цитоплазме.

Клетки клона 6Н линии НЕК293 Phoenix, содержащие 100-150 повторов в гене *HTT*, часто имели неправильную форму, содержали крупные округлые или овальные ядра и характеризовались более высокой плотностью органелл в цитоплазме, чем контрольные клетки линии НЕК293 Phoenix (Рис. 27, а). Многие митохондрии имели морфологические нарушения: нетипичную форму (Рис. 27, б), частые выпячивания оболочки (Рис. 27, в, г), разреженные области матрикса, лишённые крист (Рис. 27, д, е), изменения формы и ориентации крист (Рис. 27, ж, з). Характерной особенностью этих клеток были контакты мембран ЭПР и митохондрий, а также взаимные контакты органелл (Рис. 28, а, б). Митохондрии контактировали с цистернами ЭПР на большом протяжении заметно чаще, чем в контроле, нередко именно в местах контакта наблюдались разрежения матрикса органелл (Рис. 28, в-ж).

Для клеток клона 6Н линии НЕК293 Phoenix была также характерна гипертрофия ЭПР, цистерны которого в большем, чем наблюдалось в контроле, количестве присутствовали в цитоплазме. Шероховатый ЭПР был представлен как короткими цистернами, распределёнными по цитоплазме (Рис. 29, а), так и стопками длинных цистерн (Рис. 29, б), вблизи которых нередко формировались окончатые мембраны (Рис. 29, в). Множество мелких везикул часто располагалось в области гладкого ЭПР (Рис. 29, г). АГ также был сильнее развит в клетках с увеличенным числом САГ повторов в гене *HTT*. Стопки узких и коротких диктиосом АГ в цитоплазме нередко встречались группами по несколько штук (Рис. 29, д). Было отмечено накопление мелких (диаметром менее 0,6 мкм) аутолизосом, формировавших иногда крупные кластеры в цитоплазме отдельных клеток (Рис. 30, а, б). Аутолизосомы имели плотное содержимое, однако по мере увеличения размера этих структур, происходило его разрежение. Нередко в аутолизосомах отмечалось нарушение целостности оболочки (Рис. 30, в-д). Крупные аутолизосомы диаметром больше 0,7 мкм встречались очень редко.

HEK293 Phoenix (<30 CAG повторов)

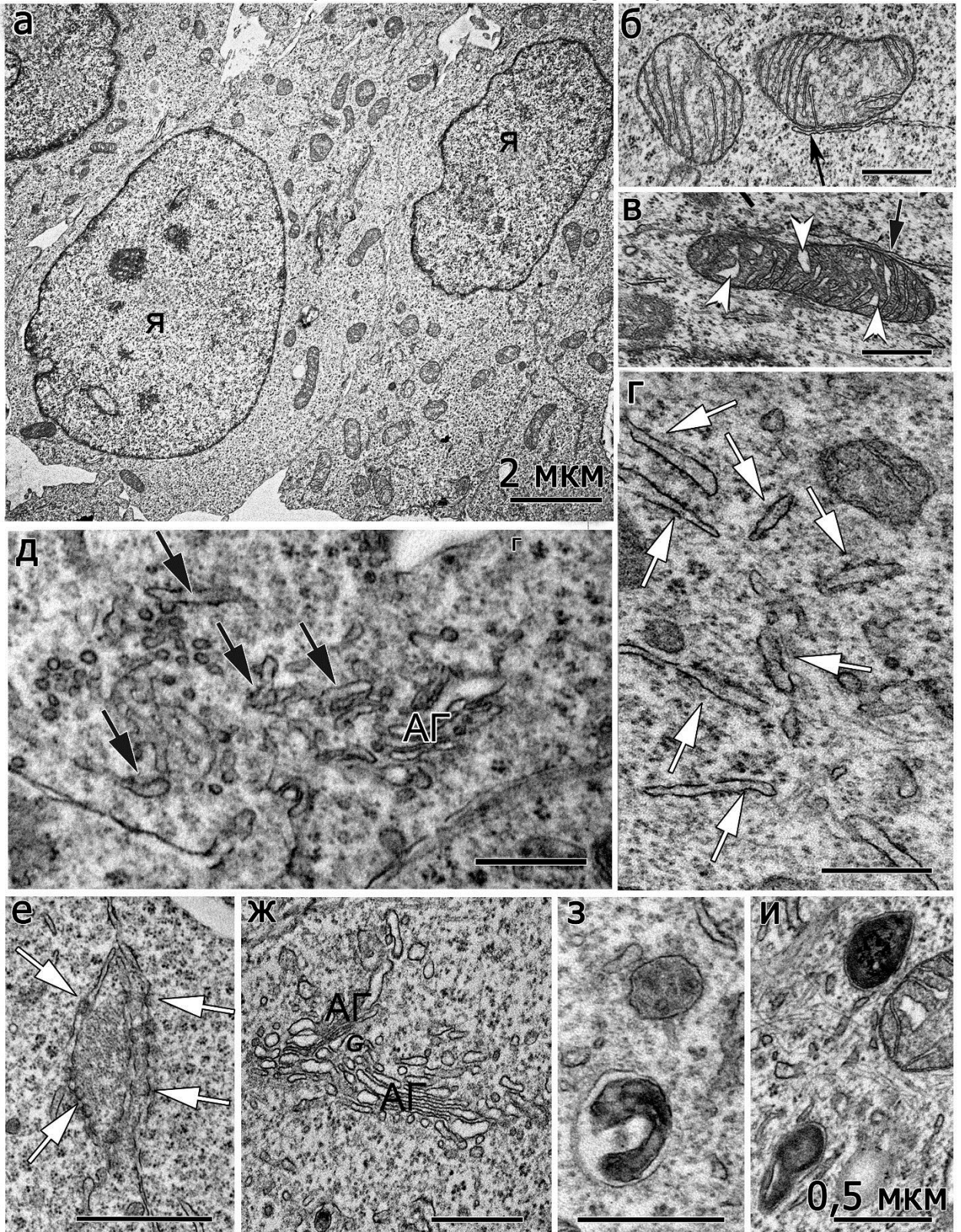


Рисунок 26. Ультраструктурная организация контрольной линии клеток HEK293 Phoenix.

а – общий вид клеток HEK293 Phoenix, Я - ядро; б – митохондрии с матриксом средней плотности и узкими кристами; в – митохондрии с плотным матриксом и слегка расширенными кристами (указаны белыми стрелками); черные стрелки на (в) указывают на контакт мембран ЭПР и митохондрий; г – короткие цистерны шероховатого ЭПР (указаны белыми стрелками); д – короткие цистерны и везикулы гладкого ЭПР (указаны черными стрелками); е – окончатые мембраны в цитоплазме клетки (указаны белыми стрелками); ж – два близко расположенных АГ; з, и – небольшие аутолизосомы с плотным содержимым. Масштаб: а – 1 мкм, б-и – 0,5 мкм.

HEK293 Phoenix клон 6Н (100-150 CAG повторов)

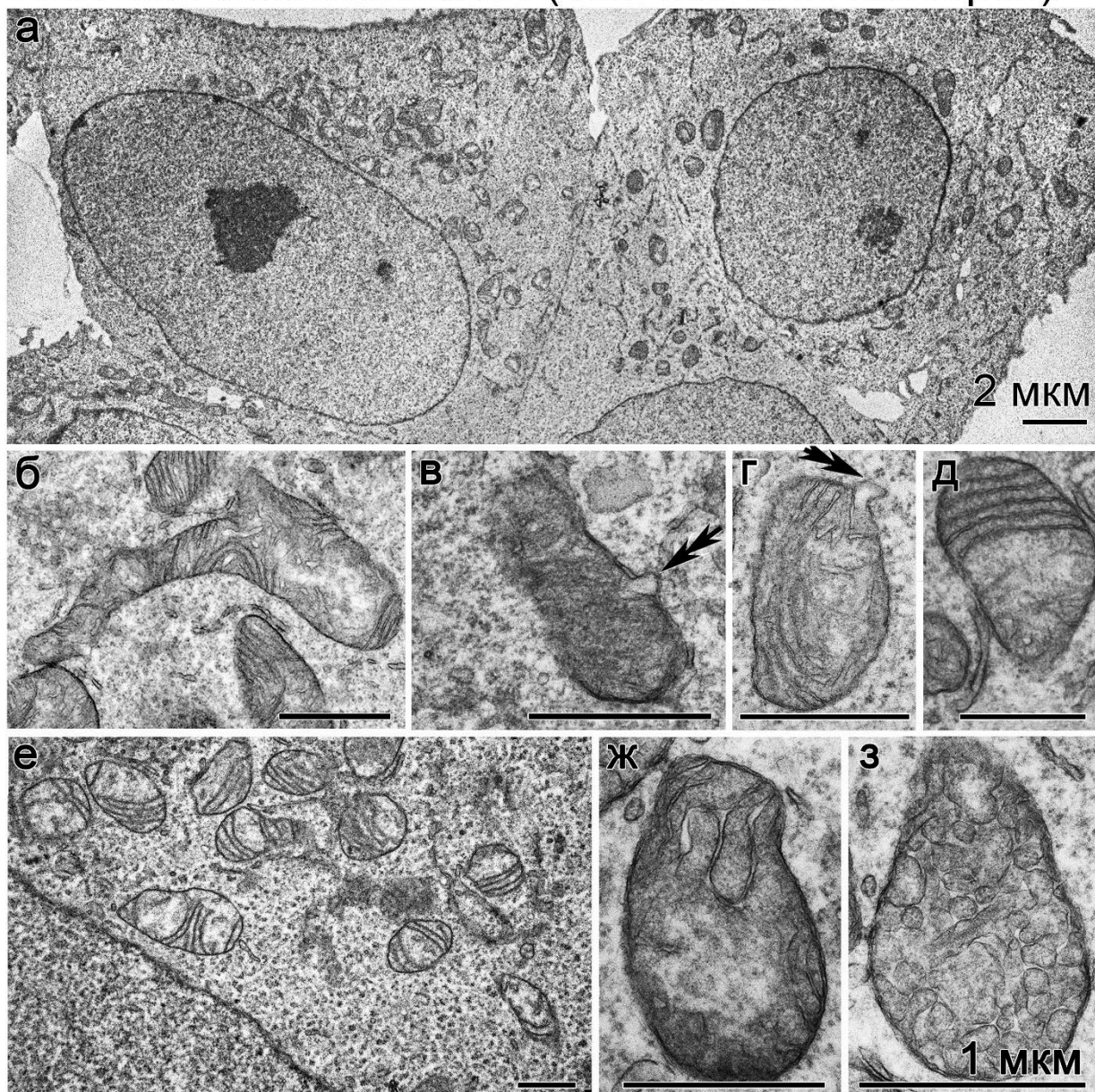


Рисунок 27. Ультраструктурная организация клеток генетически модифицированного клона 6Н линии HEK293 Phoenix со встройкой 100-150 повторов CAG в ген *HTT*.

а – общий вид клеток; б – митохондрия необычной формы с атипичным расположением крист; в-г – нарушение строения оболочки митохондрий (указано двойными стрелками); д – частичное отсутствие крист в матриксе митохондрий; е – скопление митохондрий с разреженным матриксом; ж-з – митохондрии с деформированными кристами. Масштаб: а – 2 мкм, б-з – 1 мкм.

HEK293 Phoenix клон 6H (100-150 CAG повторов)

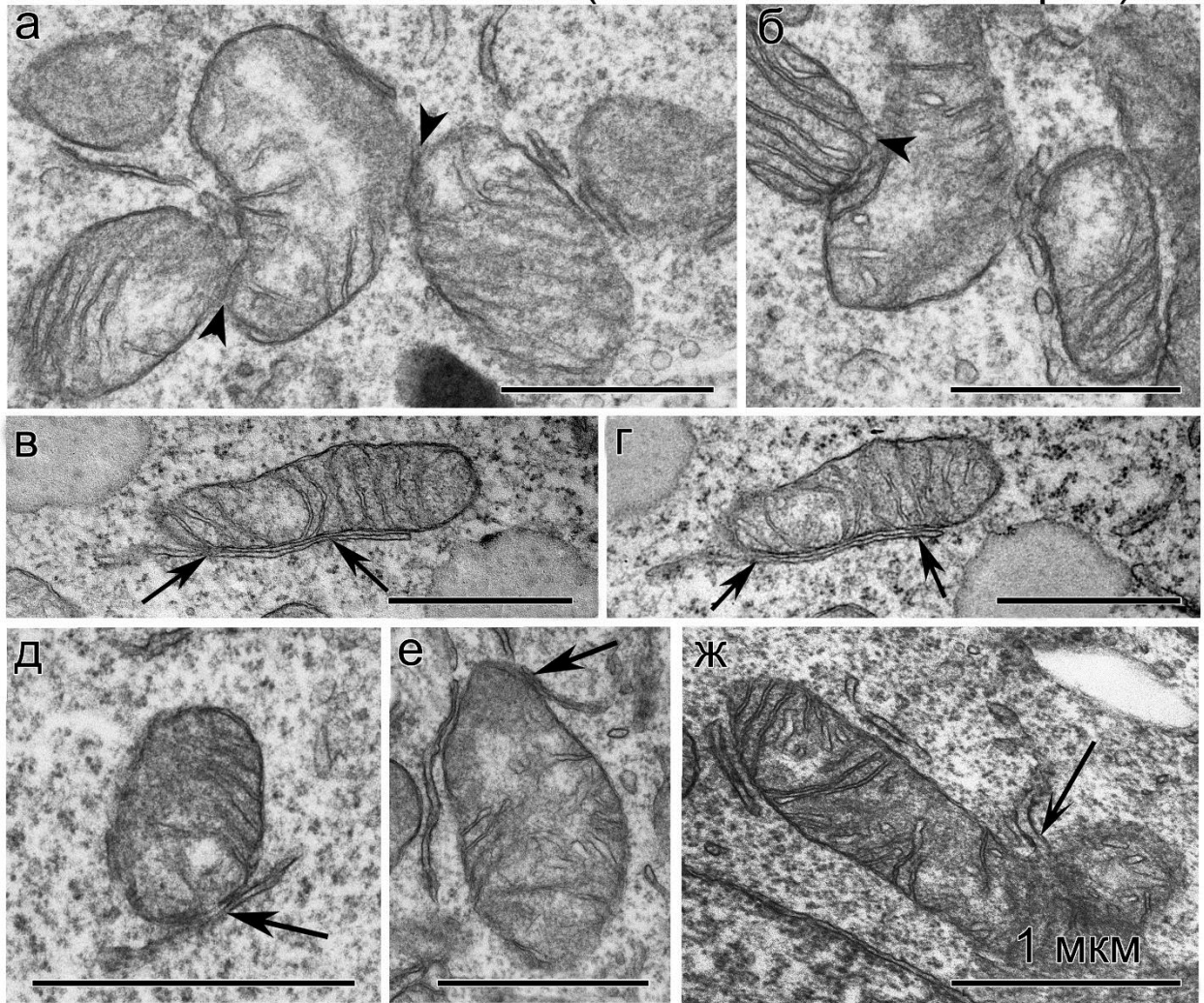


Рисунок 28. Контакты митохондрий между собой и с мембранами ЭПР в клетках клона 6H линии HEK293 Phoenix с увеличенным до 100-150 числом CAG повторов в гене *HTT*.

а-б – тесные взаимные контакты дефектных митохондрий (указаны головками черных стрелок); в-г – серийные срезы митохондрии, контактирующей с мембраной гладкого ЭПР на большом протяжении (указано стрелками); д, е – тесный контакт митохондрий, содержащих разреженный матрикс, с мембранами ЭПР (указано стрелками); ж – контакт ЭПР с двумя митохондриями в области их слияния.

HEK293 Phoenix клон 6H (100-150 CAG повторов)

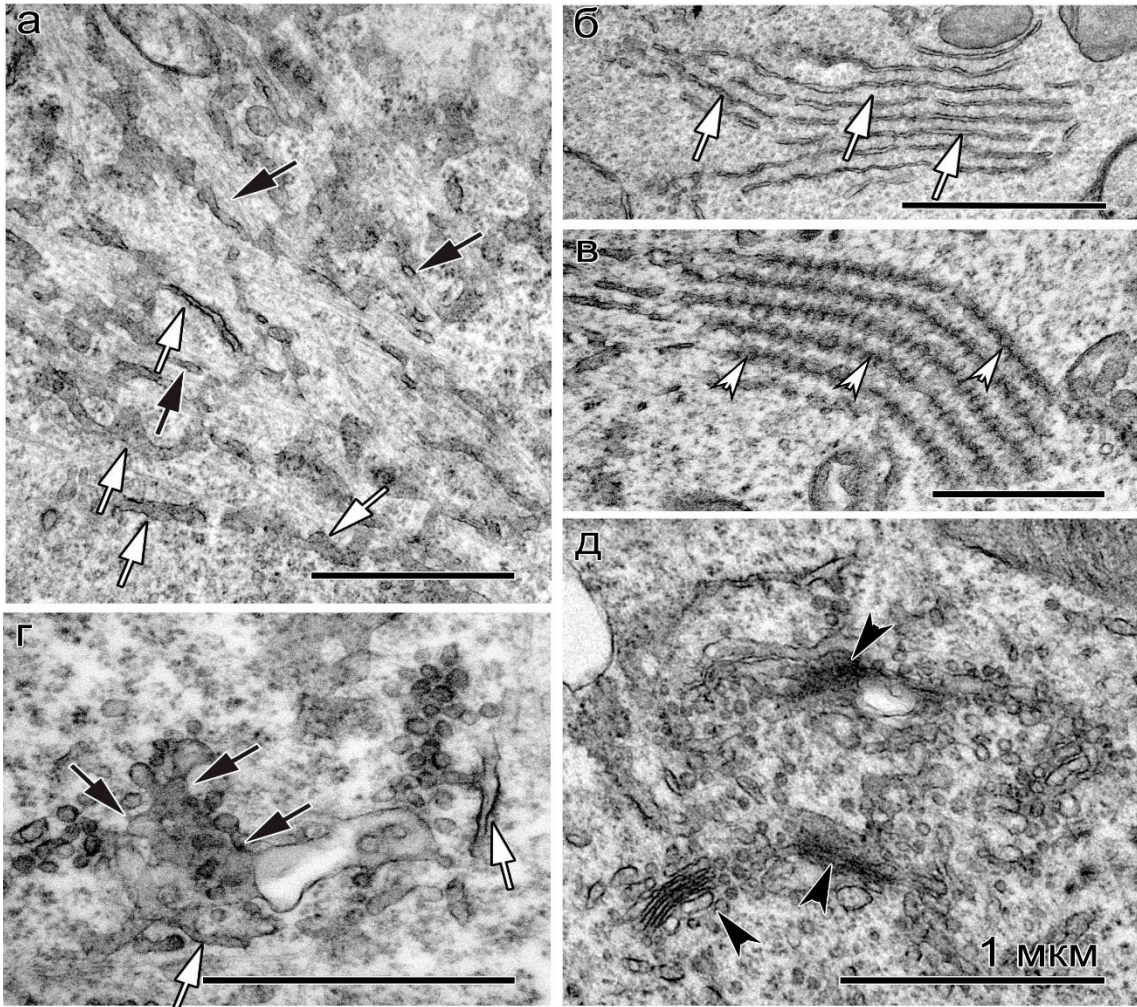


Рисунок 29. Ультраструктурная организация гладкого и шероховатого ЭПР и АГ в клетках клон 6H линии HEK293 Phoenix с увеличенным до 100-150 числом CAG повторов в гене *HTT*.

а – многочисленные цистерны шероховатого (указаны белыми стрелками) и гладкого (указаны черными стрелками) ЭПР, а также филаменты и микротрубочки в цитоплазме между ними; б – скопление узких цистерн шероховатого ЭПР (указано белыми стрелками); в – скопление оконччатых мембран (указаны белыми головками стрелок); г – цистерны гладкого (указаны черными стрелками) и шероховатого (указаны белыми стрелками) ЭПР с отделяющимися от них везикулами; д – скопление нескольких АГ (указаны черными головками стрелок) с короткими диктиосомами в цитоплазме клетки. Масштаб: 1 мкм.

HEK293 Phoenix клон 6H (100-150 CAG повторов)

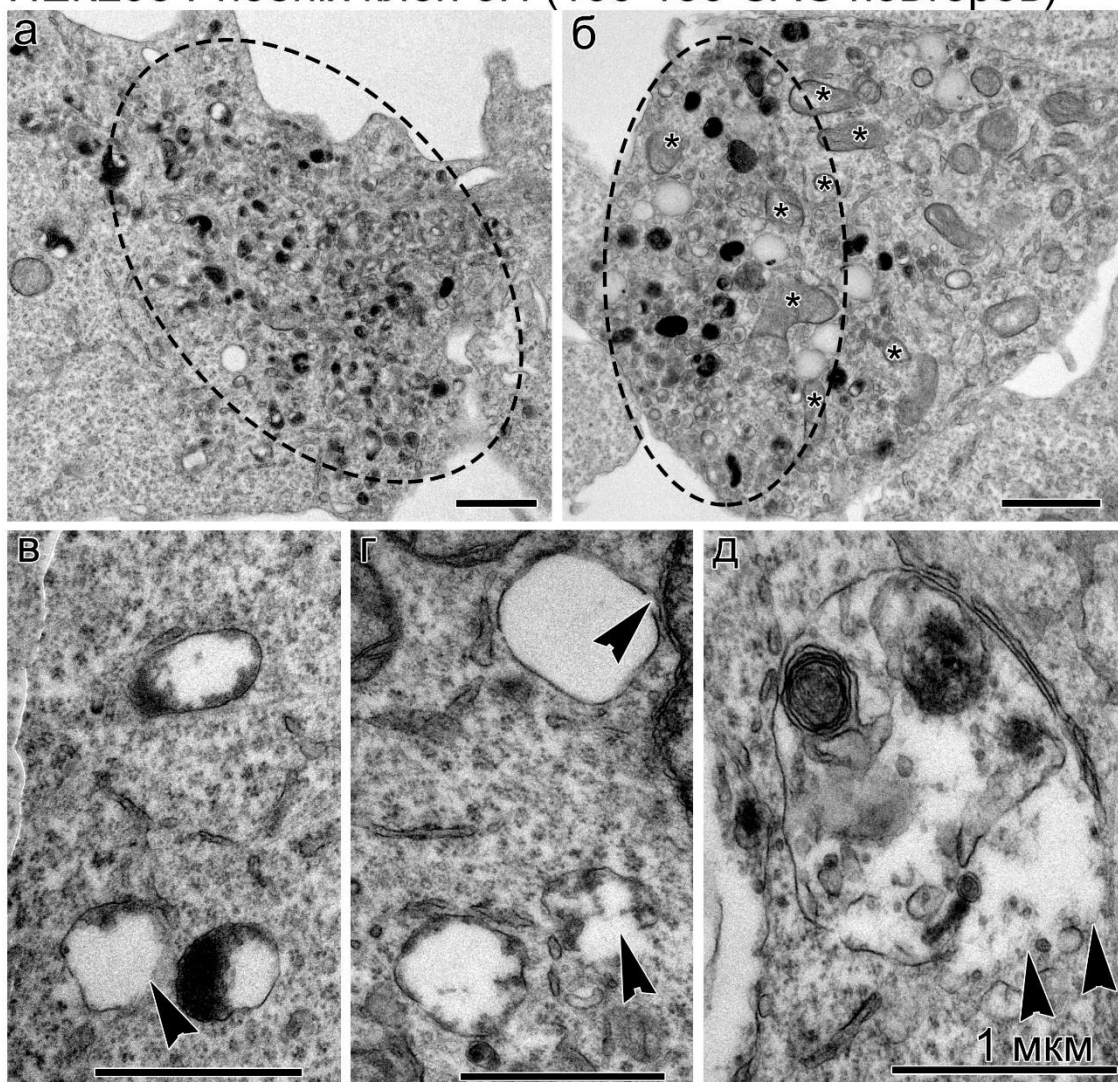


Рисунок 30. Нарушения ультраструктурной организации аутолизосом в клетках клона 6H линии HEK293 Phoenix с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*.

а-б – фрагменты клеток, содержащие крупные скопления мелких аутолизосом с частично переваренным плотным содержимым (обведено пунктиром), наблюдаются дефектные митохондрии (указаны звездочками); в-г – мелкие аутолизосомы с плотным содержимым, расположенным по периферии, и светлым центром, черными головками стрелок отмечены разрывы в оболочках аутолизосом; д – крупная аутолизосома с нарушенной целостностью оболочки (указано головками черных стрелок), содержащая остатки цитоплазматических органелл. Масштаб: 1 мкм.

3.3.2. Сравнение ультраструктурной организации исходных и генетически модифицированных клеток линии НЕК293 FT, несущих 100-150 САG повторов в гене *HTT*

Морфология клеток исходной линии НЕК293 FT была в целом идентична организации клеток НЕК293 Phoenix. Клетки часто имели неправильную форму с округлыми ядрами и цитоплмой, обогащенной органеллами, которые группировались вблизи ядра (Рис. 31, а). Митохондрии имели в основном матрикс средней плотности и узкие кристы (Рис. 31, б, в). Многочисленные узкие и длинные цистерны шероховатого ЭПР располагались вблизи ядра и среди митохондрий (Рис. 31, д, г) в некоторых клетках наблюдались слегка расширенные цистерны шероховатого ЭПР. Короткие цистерны гладкого ЭПР формировали небольшое количество везикул. Следует отметить, что в цитоплазме клеток НЕК293 FT чаще встречались окончатые мембраны, часто расположенные вблизи цистерн шероховатого ЭПР (Рис. 31, е, ж). Стопки АГ состояли из узких диктиосом и располагались в виде скоплений, как и в клетках НЕК293 Phoenix (Рис. 31, з). В клетках присутствовали мелкие аутолизосомы диаметром около 0,3 мкм с плотным содержимым (Рис. 31, и).

Клетки генетически модифицированного клона F1 со 100-150 САG повторами, полученного из исходной линии НЕК293 FT, характеризовались крупным ядром и скоплениями мембранных органелл в цитоплазме (Рис. 32, а). Часто наблюдались митохондрии необычной формы (Рис. 32 б, в), они нередко контактировали друг с другом, имели структурные нарушения, в том числе выпячивания оболочки (Рис. 32, г), не характерные для исходных клеток НЕК293 FT, а также разрежение матрикса и исчезновение крист в этой области (Рис. 32, д). Эти изменения были идентичны тем, что выявлялись в клетках клона 6Н линии НЕК293Phoenix с увеличенным числом САG повторов в гене *HTT*. В то же время некоторые митохондрий имели дефекты, которые мы ранее не наблюдали в клетках клона 6Н. К ним относится присутствие митохондрий, содержащих круглые плотные кристы

(Рис. 32, е). Как и в клетках клона 6Н, митохондрии чаще тесно контактировали с цистернами ЭПР, чем в клетках исходной линии НЕК293 FT (Рис. 33, а-в).

Несмотря на то, что в исходных клетках НЕК293 FT ЭПР был достаточно хорошо развит, в клетках клона F1, несущего 100-150 САG повторов в гене *HTT*, присутствие цистерн ЭПР в цитоплазме было более выраженным. Шероховатый ЭПР состоял из узких длинных цистерн, часто собранных в скопления (Рис. 33, г), а цистерны гладкого ЭПР были нередко расширены, и от них отшнуровывались мелкие везикулы (Рис. 33, д). Стопки АГ состояли из большого количества узких диктиосом и везикул и тоже нередко образовывали скопления (Рис. 33, е). В цитоплазме клеток клона F1 чаще, чем в клетках клона 6Н линии НЕК293 Phoenix, встречались скопления окончатых мембран, контактирующих с цистернами шероховатого ЭПР (Рис. 34, а, б). Следует отметить, что иногда мембраны шероховатого, а также гладкого ЭПР слипались между собой и формировали четырехслойные мембранные структуры (Рис. 34, в, г), вблизи которых часто наблюдались окончатые мембраны (Рис. 34, д, е). В участках цитоплазмы клеток, обогащенной подобными многослойными мембранами, наблюдались скопления описанных выше дефектных митохондрий с круглыми кристами и признаками их фрагментации (Рис. 34, г). Присутствие аутолизосом в клетках этого клона также возрастало. Мелкие аутолизосомы имели гетерогенное содержимое (Рис. 35, а), как и в клетках клона 6Н. В крупных аутолизосомах выявлялись разрывы оболочки и выделение через них содержимого в цитоплазму (Рис. 35, б-д).

HEK293 FT (<30 CAG повторов)

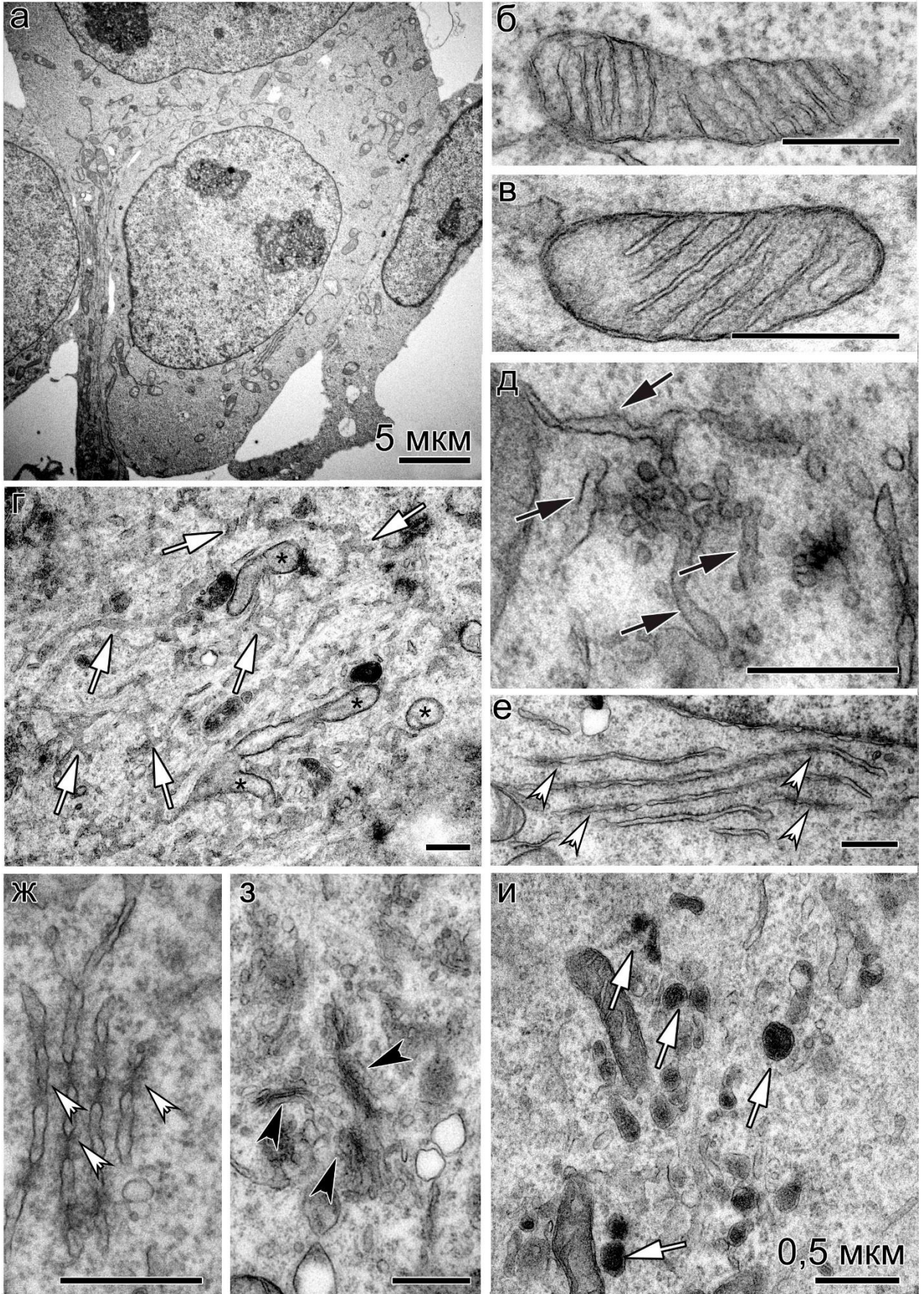


Рисунок 31. Ультраструктурная характеристика клеток исходной линии НЕК293 FT.

а – общий вид клеток; б-в – митохондрии с матриксом средней плотности и узкими кристами; г – скопления коротких цистерн гладкого и шероховатого ЭПР в цитоплазме клетки (указаны белыми стрелками), * отмечены митохондрии со светлым матриксом; д – цистерны гладкого ЭПР (указаны черными стрелками) с отделяющимися от них немногочисленными пузырьками; е, ж – окончатые мембраны (указаны белыми головками стрелок), представленные узкими и длинными цистернами шероховатого ЭПР со встроенными в них поровыми комплексами; з – скопление нескольких АГ (указаны черными головками стрелок) с короткими диктиосомами; и – мелкие аутолизосомы с электронно-плотным содержимым (указаны белыми стрелками). Масштаб: а – 5 мкм, б-и – 0,5 мкм.

НЕК293 FT клон F1 (100-150 CAG повторов)

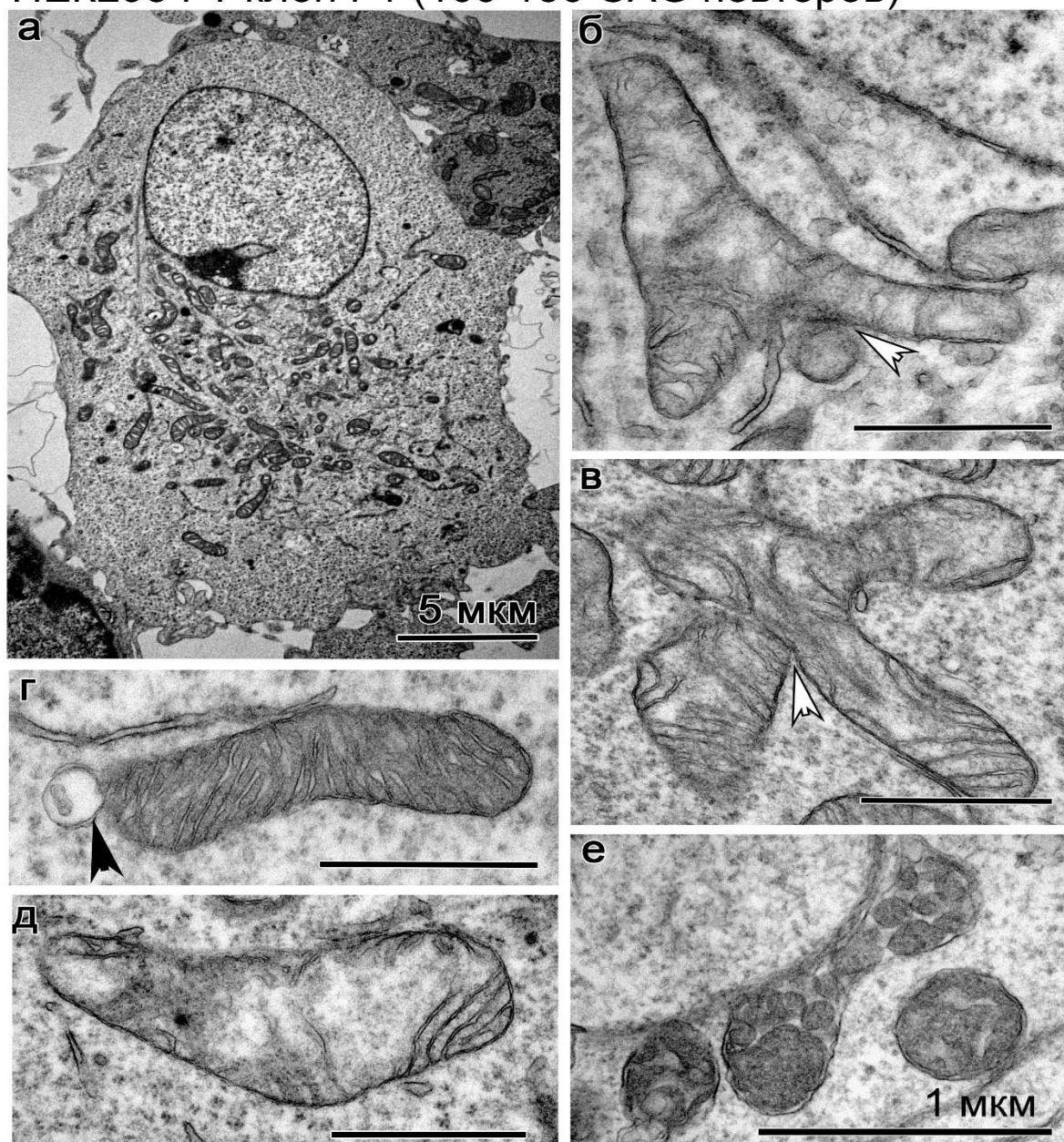


Рисунок 32. Ультраструктурная организация клеток клона F1 линии НЕК293 FT со встройкой 100-150 повторов в ген *HTT*.

а – общий вид клетки; б-в – митохондрии атипичной формы с нарушенным расположением крист, белыми головками стрелок указаны контакты двух митохондрий; г – дефектная митохондрия с выпячиванием оболочки (указано черной головкой стрелки); д – дефектная митохондрия с разреженным матриксом и нарушенным расположением крист; е – дефектные митохондрии с необычными плотными круглыми кристами. Масштаб: а – 5 мкм, б-е – 1 мкм.

НЕК293 FT клон F1 (100-150 CAG повторов)

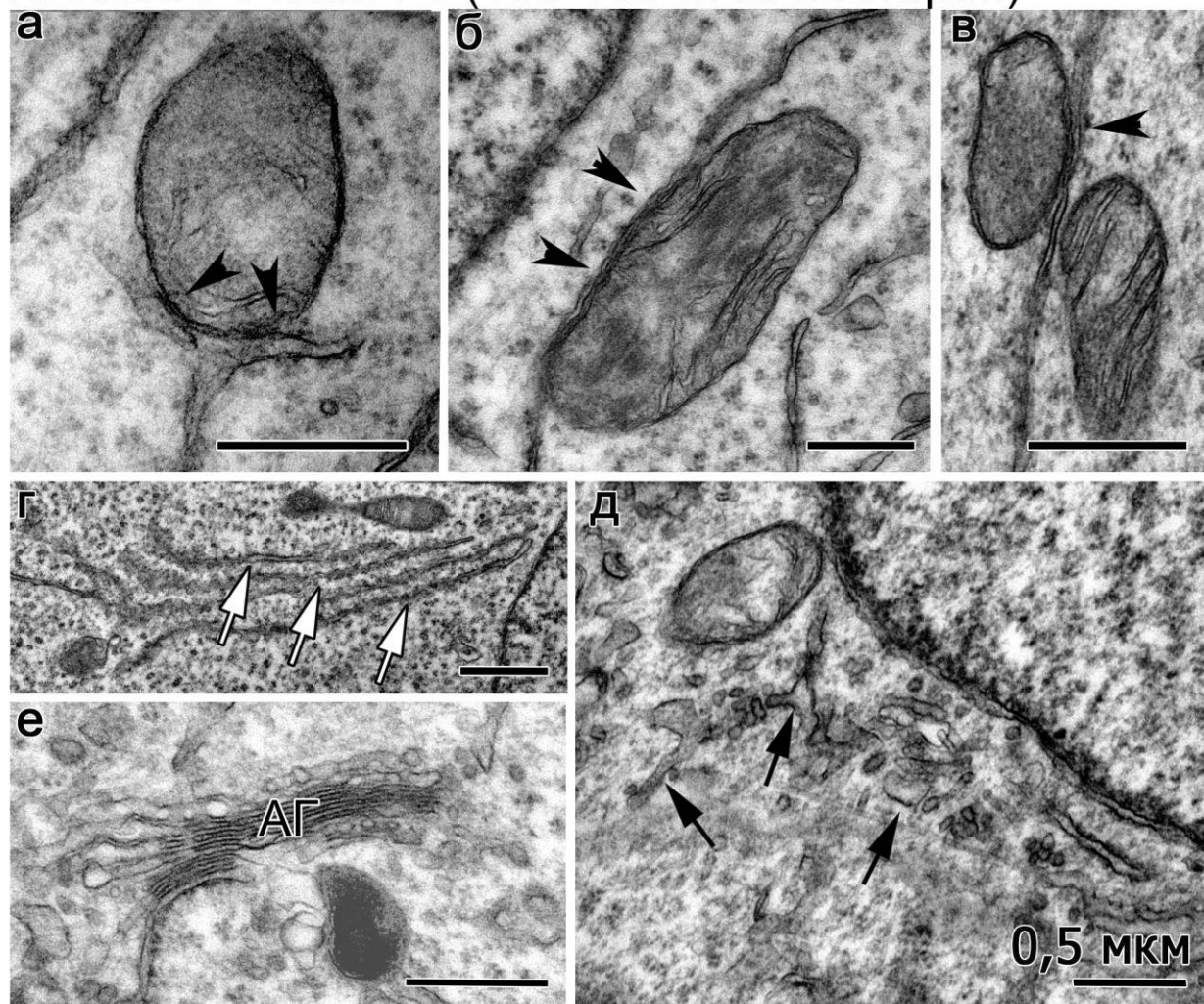


Рисунок 33. Ультраструктура митохондрий, ЭПР и АГ в клетках клона F1 линии НЕК293 FT с увеличенным до 100-150 числом CAG повторов в гене *HTT*.

а-в – тесный контакт мембран шероховатого ЭПР с митохондриями (указан черными головками стрелок); г – длинные узкие цистерны шероховатого ЭПР (указаны белыми стрелками); д – цистерны гладкого ЭПР с отделяющимися от них везикулами (указаны черными стрелками); е – стопка узких диктиосом АГ.

HEK293 FT клон F1 (100-150 САG повторов)

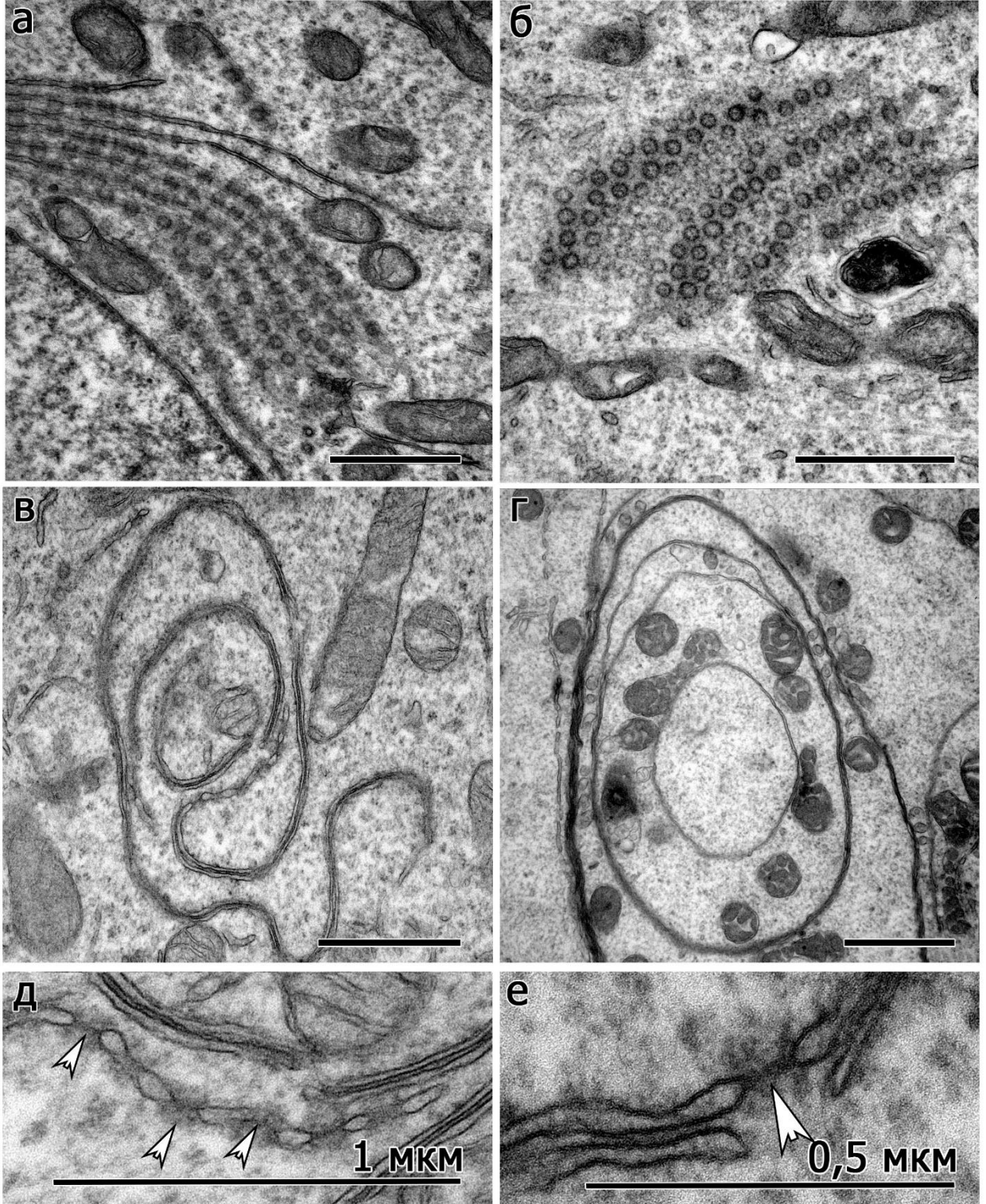


Рисунок 34. Окончатые мембраны и многослойные мембранные структуры в клетках клона F1 линии НЕК293 FT с увеличенным до 100-150 числом CAG повторов в гене *HTT*.

а-б – скопления окончатых мембран в цитоплазме клетки на продольном (а) и поперечном (б) срезах; в-г – 4-х слойные мембранные структуры и дефектные митохондрии в цитоплазме клеток; д – фрагменты многослойных мембранных структур, состоящих из гладких мембран на большом увеличении, в одну из цистерн ЭПР встроены пороподобные комплексы (указаны белыми головками стрелок); е – пороподобный комплекс (указан белой головкой стрелки) в составе 4х- слойной мембраны. Масштаб: а-д – 1 мкм, е - 0,5 мкм.

НЕК293 FT клон F1 (100-150 CAG повторов)

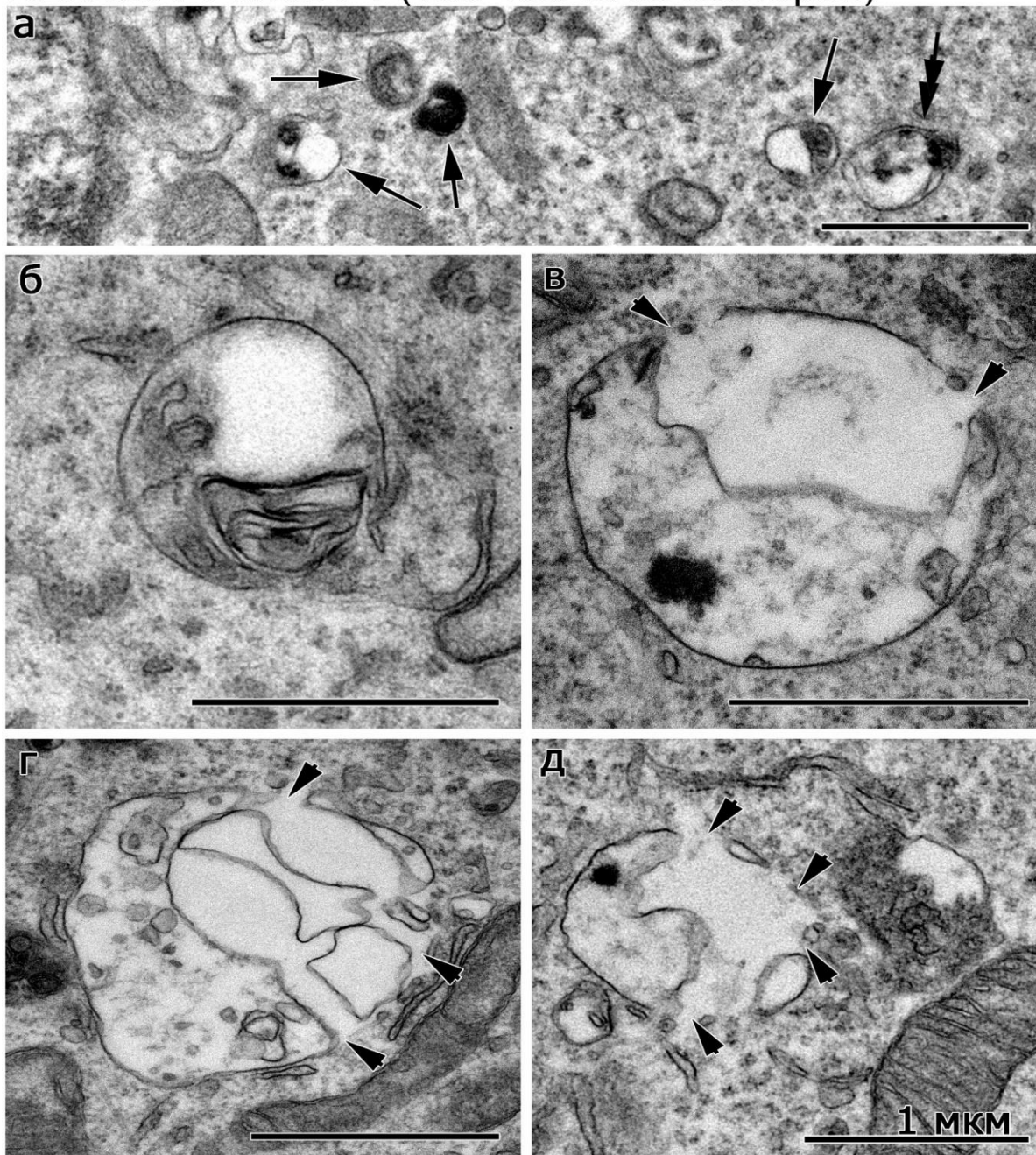


Рисунок 35. Нарушение строения аутолизосом в клетках клона F1 линии НЕК293 FT с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*.

а – небольшое скопление мелких аутолизосом с плотным содержимым (указано черными стрелками), двойная стрелка указывает на аутофагосому, имеющую 2 мембраны. б-д – крупные аутолизосомы с нарушениями целостности оболочки и разрывами в ней (указаны черными головками стрелок), приводящими к выделению содержимого органелл в цитоплазму. Масштаб: 1 мкм

3.3.3. Морфометрический анализ количества митохондрий и аутолизосом в клетках клонов НЕК293 со 100-150 САG повторами в гене *HTT*

С целью количественной оценки выявленных при электронно-микроскопическом анализе нарушений структуры органелл клеток НЕК293 с большим количеством САG повторов, нами был проведен морфометрический анализ параметров дефектных митохондрий, частоты контактов этих органелл с мембранами шероховатого ЭПР, а также численной плотности аутолизосом.

Анализ популяции митохондрий с различными морфологическими дефектами, такими как нарушение ориентации крист, разрежение матрикса, а также выпячивание оболочки, продемонстрировал присутствие 20-26% подобных органелл в клетках исходных линий, НЕК293 Phoenix и НЕК293 FT. При этом доля митохондрий с дефектами крист и матрикса составляла 16% и 25%, соответственно, а доля митохондрий с повреждениями оболочки составляла 1,8% и 1,3 %, соответственно (Рис. 36, а). В клетках клонов 6Н и F1 с увеличенным до 100-150 числом САG повторов в гене *HTT* процент поврежденных органелл увеличивался, по сравнению с контролем, в 2 и 1,7 раз и составлял 38% и 45% митохондрий, соответственно. Разрежение матрикса и нарушение строения крист митохондрий в клетках вышеупомянутых клонов выявлялись в 2 и 2,5 раза чаще, чем в контроле и присутствовали в 32% и 36% митохондриях, соответственно. Дефекты оболочки митохондрий выявлялись в 2,7 и 8 раз чаще, чем в контроле и присутствовали в 5,5% и 9% митохондриях соответственно (Рис. 36, а). Также в клетках обоих клонов в 1.5 раза по сравнению с контролем возрастала частота контактов митохондрий с мембранами ЭПР. В контрольных клетках вышеупомянутых клонов этот параметр составлял 21% и 24% соответственно, а в клетках клонов 6Н и F1 с увеличенным до 100-150 числом САG повторов в гене *HTT* он возрастал до 33% и 38% соответственно

(Рис. 36, б). Таким образом, в клетках обоих клонов HEK293 сильнее увеличивалась доля митохондрий с нарушениями матрикса и крист.

Морфометрический анализ показал, что в контрольных клетках HEK293 Phoenix и HEK293 FT аутолизосом присутствовало меньше, чем в нейронах (Рис. 36, в). Относительное количество аутолизосом в клетках клонов 6Н и F1 со встройкой дополнительных CAG повторов в гене *HTT* возрастало в 2 раза с 0,03 ед/мкм² до 0,06 ед/мкм² в HEK293 Phoenix и 6Н и с 0,02 ед/мкм² до 0,05 ед/мкм² в HEK293 FT и F1.

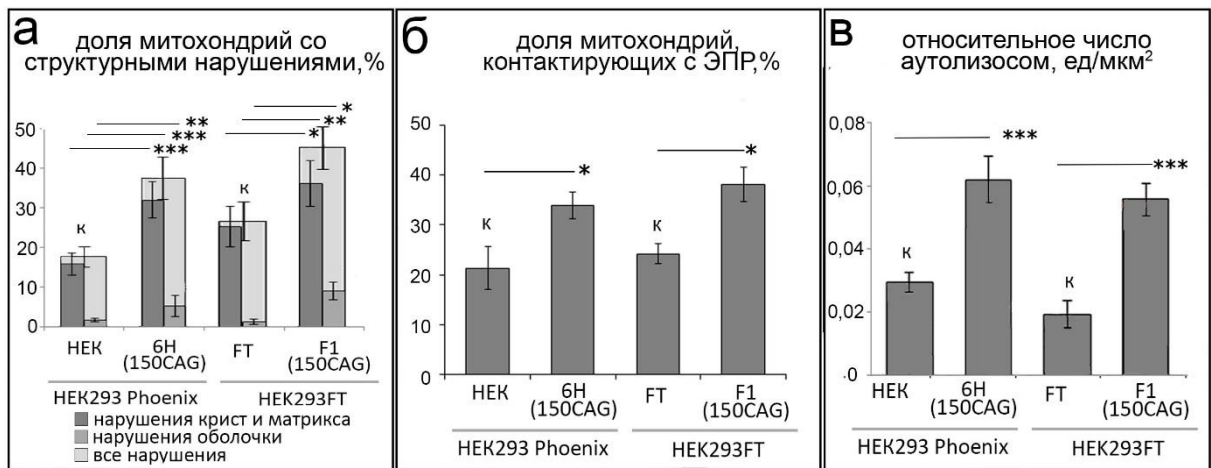


Рисунок 36. Оценка количества митохондрий с нарушенной структурой, а также контактирующих с ЭПР и аутолизосом в генетически модифицированных клонах 6Н и F1 клеток HEK293, несущих встройку 100-150 CAG повторов в ген *HTT*, по сравнению с изогенными им контрольными линиями HEK293 Phoenix и HEK293 FT, соответственно.

а – доля дефектных митохондрий с нарушенным строением крист и матрикса, а также оболочки, увеличена в клетках клонов 6Н и F1; б – процент митохондрий, контактирующих с мембранами ЭПР, увеличен в клетках клонов 6Н и F1; в – относительное число аутолизосом на 1 мкм² цитоплазмы увеличено в клетках клонов 6Н и F1. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$, планка погрешности демонстрирует стандартную ошибку.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

БХ относится к нейродегенеративным заболеваниям и интенсивно исследуется, однако, многие процессы, лежащие в основе данной патологии, до сих пор недостаточно изучены. Функции нормального белка Htt и механизм, посредством которого мутантный белок опосредует патологический эффект на строение клеток, пока не полностью выяснен. Показано, что Htt взаимодействует с некоторыми моторными белками и может работать как молекулярный скаффолд, влияя на регуляцию разных клеточных процессов, включая транскрипцию ядерных генов, эндоцитоз, транспорт везикул, функционирование митохондрий и передачу возбуждения в синапсах (Saudou, Humbert, 2016; Vitet et al., 2020; Barron et al., 2021). Для выявления нарушений в структурной организации клеток с увеличенным разным числом CAG повторов гене *HTT*, в настоящей работе была использована просвечивающая электронная микроскопия. Дополнительный сравнительный анализ структурных нарушений в нейронах пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронов с разным числом CAG повторов, а также дефектов в клетках НЕК293 со 150 CAG повторами в гене *HTT*, позволил продемонстрировать связь между ростом патологических нарушений в клетках и увеличением числа CAG повторов.

4.1. Сходство морфологических дефектов в мутантных клетках с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*

Проведенное сравнительное исследование структурной организации мутантных нейронов в составе пациент-специфичных и генетически модифицированных моделей БХ выявило схожие ультраструктурные дефекты в организации компонентов трёх функциональных клеточных систем: ЭПР, митохондрий и аутолизосом (см. Таблицу 2).

	42-47 CAG повторов	69 CAG повторов	100-150 CAG повторов
	пациент-специфичные нейроны	генетически модифицированные нейроны	генетически модифицированные клетки НЕК293
увеличение доли митохондрий с нарушениями	в 3 раза	в 2,3 – 3 раза	в 1,7-2 раза
увеличение доли митохондрий, контактирующих с ЭПР	в 1,5 -1,8 раза	в 1,3-1,8 раза	в 1,5 раза
увеличение количества аутолизосом	в 2 раза	в 1,6 раза	в 2 раза

Таблица 2. Сравнение уровня изменений доли дефектных митохондрий и митохондрий, контактирующих с ЭПР, а также относительного числа аутолизосом в мутантных клетках разных моделей (пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах и клетках НЕК293) по сравнению с соответствующими контролями.

4.1.1. Особенности негативного влияния повышенного числа CAG повторов на структурную организацию шероховатого и гладкого ЭПР

Комплекс ЭПР, согласно современным представлениям, включает в себя несколько функциональных доменов: наружную мембрану ядерной оболочки, в которую встроены ядерные поры, шероховатый ЭПР в форме вытянутых цистерн, на поверхности которых располагаются рибосомы, осуществляющие синтез белков, и тубулы гладкого ЭПР без рибосом, участвующие в синтезе мембранных липидов, в частности фосфолипидов (Sree et al., 2021; Perner, Krüger, 2022). Согласно нашим данным, типичная организация шероховатого и гладкого ЭПР характерна для контрольных нейронов, содержащих нормальное число CAG повторов в гене *HTT*.

Наши исследования показали, что в цитоплазме клеток с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* наблюдается более существенное, чем в норме, накопление небольших везикул размером около 30 нм вблизи цистерн

ЭПР (Рис. 6, Рис. 17). Это позволяет предполагать, что транспорт синтезируемых в ЭПР белков, липидов и фосфолипидов нарушен. Известно, что синтезируемые в шероховатом и гладком ЭПР белки и фосфолипиды перемещаются в везикулы и транспортируются к АГ, где происходит их дальнейшая посттрансляционная модификация и распределение в разные компартменты клетки (Shi et al., 2022). Предполагается, что нарушение транспорта между ЭПР и АГ может приводить к стрессу ЭПР в клетках с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* (Ghemrawi, 2020; Liu et al., 2021).

Как показали многие исследования, роль Htt во внутриклеточном и мембранном транспорте обусловлена его связью с различными белками-партнерами, которые опосредуют его взаимодействие с элементами цитоскелета (Taran et al., 2020; Wu, 2022). Например, хантингтин-ассоциированный белок 1 (HAP1) связывает Htt как с кинезином, движущимся к плюс-концу микротрубочки, так и с моторным белком динеином, направленным к их минус-концу (Chen et al., 2023). Это подчеркивает важность Htt для перемещения по микротрубочкам как в теле нейрона, так антероградного и ретроградного аксонального транспорта (Li et al., 1995; Engelender et al., 1997; Li, Li, 2005). Согласно современным представлениям, мутация в гене *HTT* приводит к формированию белка с неправильной структурой, что нарушает его взаимодействие с его белками-партнерами, в результате чего везикулярный транспорт в цитоплазме нейронов нарушается (Vidal et al., 2011; Brandstaetter et al., 2014). Совокупность вышеизложенных данных поддерживает наше предположение о нарушении транспорта везикул от ЭПР в область АГ в исследованных нами пациент-специфичных генетически модифицированных нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*.

Следует отметить, что стресс ЭПР считается одним из ключевых факторов патогенеза при других нейродегенеративных заболеваниях, включая БА, БП, БАС и прионные заболевания, которые также

характеризуются накоплением и агрегацией неправильно свернутых белков (Ghemrawi, 2020). В соответствии с тем, что Htt может быть вовлечен в регуляцию внутриклеточного транспорта (Gauthier et al., 2004), наблюдаемое нами накопление везикул вблизи ЭПР может указывать на нарушение этого процесса. Высказано предположение, что нарушение везикулярного трафика на различных стадиях, особенно между ЭПР и АГ, может вызывать скопление транспортных пузырьков и вследствие этого непосредственно влиять на функцию ЭПР, провоцируя его стресс (Vidal et al., 2011). Это было продемонстрировано при изучении внутриклеточного транспорта в первичных фибробластах мышей линии Htt^{140Q/140Q} с гомозиготной встройкой, где было установлено, что экспрессия mHtt нарушает транспорт между ЭПР и АГ (Brandstaetter et al., 2014). Кроме того, при изучении нейронов мышей с встроенным в их геном человеческим геном *HTT* со 111 CAG повторами было показано снижение аксонального транспорта, а также транспорта везикул от АГ, в том числе несущих нейротрофический фактор BDNF, важный для выживания стриарных нейронов (Gauthier et al., 2004). Используя мышиную модель с 150 CAG повторами, Orr и др. (2010) продемонстрировали также нарушение перемещения митохондрий в теле и отростках нейронов (Gauthier et al., 2004; Li et al., 2010).

ЭПР является основным местом синтеза мембранных белков и фосфолипидов, которые перераспределяются между всеми органеллами в клетке. При этом мембраны ЭПР контактируют со многими органеллами, включая митохондрии, липидные капли, а также с плазматической мембраной (Sree et al., 2021). Показано, что при многих нейродегенеративных заболеваниях стресс ЭПР может негативно влиять на функциональную организацию органелл, с которыми он контактирует (Fowler et al., 2019).

4.1.2. Возможные причины роста числа дефектных митохондрий в нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*

Функциональное состояние митохондрий особенно важно для эффективной жизнедеятельности нервных клеток, поскольку они обеспечивают производство энергии, участвуют в регуляции гомеостаза Ca^{2+} , а также вовлечены в процессы клеточного стресса, апоптоза и некроза (Supinski et al., 2020). Особенное значение при нейродегенеративных заболеваниях имеют контакты ЭПР с митохондриями, поскольку они выполняют важную роль в функционировании нейронов, включая деление митохондрий, гомеостаз Ca^{2+} и апоптоз (Ghemrawi, 2020; Vallese et al., 2020).

Проведенное нами исследование показало, что как в пациент-специфичных, так и в генетически модифицированных нейронах исследованных культур, а также клетках НЕК293 с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* выявляются многочисленные дефекты митохондрий: нарушение регулярности расположения и формы крист, разрежение матрикса и деформация оболочки этих органелл (Рис.5, 16, 25, 30). Аналогичные дегенеративные изменения в структуре митохондрий клеток, включая разрежение матрикса и деформацию крист, были описаны ранее при изучении биоптатов головного мозга пациентов с БХ (Tellez-Nagel et al., 1974), пациент-специфических фибробластов и миобластов (Squitieri et al., 2010), посмертных срезов клеток головного мозга пациентов (Roos, Bots, 1983) а также клеток мозга трансгенных мышей, моделирующих БХ, со 150 CAG повторами в гене *HTT* (Bayram-weston et al., 2012). Следует отметить, что нарушения функциональной организации митохондрий наблюдалось в нейронах при исследовании других нейродегенеративных заболеваний, таких как БА, БП и БАС (Lin, Beal, 2006; Deng et al., 2008; Swerdlow et al., 2010).

Согласно нашим морфометрическим данным, количество митохондрий с различными дефектами в пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах, а также клетках НЕК293 с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* увеличивалось в 1,7 – 3 раза по сравнению

с клетками соответствующих контрольных линий (Рис. 9, 21, 34). Не исключено, что нарушение морфологии митохондрий, наблюдаемое нами, вызвано повреждающим действием активных форм кислорода (АФК), увеличение концентрации которых в клетках при БХ было ранее описано во многих работах (Zhou et al., 2022). Исследования посмертных образцов пациентов с БХ демонстрируют различные окислительные повреждения клеток, такие как увеличение цитоплазматического липофусцина, разрывы нитей ДНК и накопление окислительных маркеров в основаниях ДНК и окисленных липидов (Stack et al., 2008). В здоровых нейронах образование активных форм кислорода является нормальным побочным продуктом клеточного дыхания в митохондриях. От накопления АФК клетки предохраняют особые ферменты - поглотители свободных радикалов. Ранее рядом авторов было показано, что mHtt связывается с промотором гена *PGC-1 α* , (активатора транскрипции генов ферментов, удаляющих АФК (Lin et al., 2004; Leone et al., 2005)), снижая его транскрипцию в стриатуме пациентов с БХ (Cui et al., 2006), в стриарных нейронах нокаутных мышей с БХ и в иммортализованных стриарных клетках (Lim et al., 2008). Таким образом, содержание АФК в клетках возрастает, что может приводить к окислительному повреждению митохондрий и нарушению их ультраструктуры, которое мы наблюдаем в своём исследовании.

Согласно нашим данным, в пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах, а также клетках НЕК293 с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* в 1,5 – 2 раза увеличивалось число контактов митохондрий с мембранами ЭПР, по сравнению с клетками без мутации в гене *HTT* (Рис. 9, 21, 34). При этом многие митохондрии, контактирующие с мембраной ЭПР на большом протяжении, имели разряжения матрикса и деформации крист (Рис 26). В последние годы большое внимание уделяется функциональной роли митохондриальных контактов с митохондриально-ассоциированными мембранами ЭПР (МАМ). Показано, что эти контакты играют важную роль в переносе ионов, липидов

и Ca^{2+} в митохондриях и таким образом могут существенно влиять на функцию органелл (Johri, Chandra, 2021). Установлено, что при многих нейродегенеративных заболеваниях, таких как БА, БП и БАС наблюдаются изменения контактов митохондрий и ЭПР (Xu et al., 2020).

Основываясь на полученных к настоящему времени данных (Filadi et al., 2017; Strubbe-Rivera et al., 2021), можно предполагать, что наблюдаемое нами увеличение доли дефектных митохондрий, взаимодействующих с мембранами ЭПР, связано с дисфункцией МАМ. Ранее было установлено, что при БХ нарушается гомеостаз кальция в цитоплазме и цистернах ЭПР. Предполагается, что гибель нейронов при БХ может быть следствием повышения концентрации ионов кальция в митохондриях при контакте их с ЭПР (Bezprozvanny, 2009; Lim et al., 2021). Показано, что нарушение гомеостаза Ca^{2+} может стимулировать формирование неспецифических пор во внутренней митохондриальной мембране, так называемых пермиабилитационных пор (mPTP) (DeRidder et al., 2023). Это может нарушать процесс синтеза АТФ и вызывать дефекты в функциональной организации митохондрий, что приводит к их гибели, и как следствие к апоптозу (Morciano et al., 2021; Strubbe-Rivera et al., 2021). Эти данные согласуются с результатами наших исследований о том, что большинство контактирующих с ЭПР митохондрий в пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах, а также клетках НЕК293 с увеличенным числом САG повторов в гене *HTT* имели существенное разрежение матрикса и нарушение морфологии крист. Таким образом, результаты проведенного нами анализа митохондриальных дефектов в пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах, а также клетках НЕК293 с увеличенным числом САG повторов в гене *HTT* коррелируют с данными других авторов, исследовавших организацию митохондрий в нейронах при БХ и других нейродегенеративных заболеваниях (Filosto et al., 2011; Xu et al., 2021).

Ещё одной возможной причиной наблюдаемого нами увеличения количества митохондрий со структурными дефектами в мутантных клетках может быть нарушение процесса удаления поврежденных митохондрий из клеток с помощью особого типа аутофагии – митофагии. Так, например, на нескольких клеточных моделях было показано, что mHtt препятствует GAPDH-зависимой митофагии (Hwang et al., 2015). В условиях окислительного стресса GAPDH подвергается окислительным модификациям и маркирует поврежденные митохондрии для прямого удаления митофагией. Удлиненный полиглутаминовый тракт mHtt аномально взаимодействует с GAPDH на внешней мембране поврежденных митохондрий, тем самым ингибируя GAPDH-управляемый захват поврежденных митохондрий аутофагосомами (Hwang et al., 2015).

4.1.3. Возможные причины нарушения аутофагии в мутантных нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*

Аутофагия, как система контроля качества клеточных структур, особенно важна для постмитотических клеток и особенно для нейронов, поскольку общее содержание измененных белков и поврежденных органелл в них не может быть уменьшено за счет перераспределения к дочерним клеткам через клеточное деление. Для выживания и нормального функционирования нейронов специальные механизмы должны идентифицировать эти нарушенные структуры и обеспечить их аутофагическую деградацию до того, как их внутриклеточное накопление приведет к нейротоксичности. Критическую роль аутофагии в поддержании гомеостаза и контроля качества белков в нейронах убедительно доказывает исследование, в котором мутация в генах белков Atg5 и 7 у мышей нарушала аутофагию в нейронах и приводила к накоплению белковых включений и нейродегенерации (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Wong, Cuervo, 2010). Помимо нейронального гомеостаза, аутофагия также играет ключевую роль в непрерывном ремоделировании нейронных окончаний, необходимом для

поддержания нейропластичности (Wang et al., 2006; Komatsu et al., 2007; Maria Fimia et al., 2007; Pickford et al., 2008).

Процесс аутофагии можно разделить на несколько ключевых стадий: образование особой незамкнутой двумембранной органеллы, фагофора, вокруг структуры, предназначенной для аутофагии; замыкание фагофора с образованием также двумембранной аутофагосомы; слияние аутофагосомы с эндосомой или лизосомой и растворение её внутренней оболочки (образование одномембранной амфисомы и аутолизосомы соответственно) (Klionsky et al., 2021). При различных нейродегенеративных заболеваниях нарушения этого процесса могут происходить на разных стадиях (Frake et al., 2015). Так при БА было показано накопление аутофагических везикул в пораженных нейронах в биоптатах мозга (Nixon et al., 2005; Boland et al., 2008).

Согласно нашим исследованиям, во всех типах клеток с увеличенным числом САG в гене *HTT* количество аутолизосом разного размера в цитоплазме увеличивалось. Хотя первоначально считалось, что подобный процесс свидетельствует об усилении аутофагии, более поздние данные указывают на то, что это накопление связано со снижением кислотности лизосом и, следовательно, невозможностью слияния их с аутофагосомами и накоплении последних. Одна из генетических форм БАС, вызываемая мутацией гена белка динактина 1 (Puls et al., 2003), сопровождается накоплением аутофагосом в дистальных отделах нейронов, поскольку нарушен их транспорт в области, богатые лизосомами (Jahreiss et al., 2008; Kimura et al., 2008). Уменьшение этого транспорта может привести к нарушению слияния аутофагосом и лизосом, что продемонстрировано накоплением аутофагосом в модельных клеточных культурах, клетках дрозофил и мышей (Ravikumar et al., 2005; Yamamoto et al., 2010).

Согласно нашим данным, в пациент-специфичных нейронах двух линий с 42 и 47 САG повторами в гене *HTT*, число аутолизосом возрастало в 2 раза по сравнению с контролем, а в генетически модифицированных

нейронах с 69 CAG повторами – в 1,6 раз (Рис. 9, 21, 34). Наши результаты согласуются с данными о накоплении аутофагосо- и аутолизосомоподобных структур в цитоплазме нейронов стриатума мыши, трансфицированных плазмидами, несущими ген *HTT* с 46 и 100 CAG повторами (Kegel et al., 2000), а также миоцитах и фибробластах пациентов с 42-46 повторами в гене *HTT* (Squitieri et al., 2010). Более того, показано, что в ИПСК с 48 CAG повторами площадь, занимаемая аутолизосомами, увеличивалась на 64% (Xiao, Drazinic, 2014)

Следует отметить, что кроме аутолизосом различного размера, содержащих электронноплотные включения, в пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* мы иногда наблюдали присутствие крупных, размером 0,8 – 1,5 мкм, прозрачных вакуолеподобных структур со скудным содержимым (Рис. 7, 18). Присутствие подобных структур было описано в работах, посвященных изучению сниженной интенсивности аутофагии в клетках с мутацией в гене *HTT* (Martinez-Vicente et al., 2010; Rui et al., 2015; Franco-Iborra et al., 2021). На нескольких разных моделях было показано, что несмотря на увеличенный уровень формирования аутофагосом, их успешное слияние с лизосомами, и нормальную активность лизосомных ферментов, круговорот белков в этих клетках существенно замедлен. Предполагается, что это обусловлено снижением эффективности поглощения клеточных компонентов аутофагической системой и может способствовать повышению уровня белковых агрегатов и дисфункциональных митохондрий, характерных для клеток с мутацией в гене *HTT*.

Согласно проведенному нами электронно-микроскопическому анализу, в пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах, а также клетках НЕК293 с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*, были обнаружены нарушения целостности мембран аутолизосом (Рис. 7, 18). В литературе это явление описано как пермиобилизация мембран лизосом (ПМЛ), которая приводит к выходу в цитоплазму интрализосомальных

компонентов, таких как катепсины, вызывая гибель клеток (Wang, Boya, 2018). В культурах генетически модифицированных нейронов с 69 CAG повторами мы наблюдали гибнущие клетки, содержащие крупные скопления аутолизосом, которые имели нарушения целостности оболочки, что согласуется с вышеописанными данными (Рис. 15).

К настоящему времени нет однозначного ответа на вопрос - что же приводит к разрушению оболочки лизосом? Согласно некоторым данным, к ПМЛ приводит изменение белкового и липидного состава лизосомальной мембраны. Повышение уровня холестерина защищает лизосомы (Appelqvist et al., 2011), в то время как гидролиз сфингомиелина повышает вероятность ПМЛ (Ullio et al., 2012). Известно, что при мутации в гене *HTT* действительно нарушен синтез холестерина, что было показано как на клеточных моделях грызунов, так и на образцах стриатума трансгенных мышей и биоптатах пациентов (Block et al., 2010). Увеличенная концентрация кальция в цитоплазме, описанная на мышинных моделях и человеческих клеточных моделях БХ (Czeredys, 2020), также предполагается в качестве причины ПМЛ (Pereira et al., 2010). Кроме того, фактором риска появления разрывов считается увеличение объема аутолизосом (Ono et al., 2003) при дисфункции литических ферментов (Platt et al., 2012; Boustany, 2013; Henry et al., 2015). Нарушение осмотического давления и pH внутри аутолизосомы приводит к увеличению притока ионов Cl^- и воды (Behr, 1997). В своей работе в пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах мы действительно нередко наблюдали разрывы оболочки крупных светлых вакуолеподобных структур размером от 0,7 до 1,5-2 мкм. Можно предположить, что это как раз такие увеличенные аутолизосомы, в которых из-за увеличения объема содержимое выглядит скудным. С другой стороны, с ростом количества повторов в генетически модифицированных нейронах и клетках НЕК293 возникновение разрывов оболочки аутолизосом наблюдалось у более мелких структур (размером 0,4-0,6 мкм) (Рис. 28, 33). Это позволяет предположить, что при меньшем количестве повторов в гене

HTT решающую роль в нарушении целостности оболочки аутолизосом играет увеличение размера структуры, а при большем количестве повторов усиливается влияние других возможных механизмов, таких как нарушение синтеза мембранных липидов и гомеостаза кальция.

4.1.4. Уменьшения числа шипиков на дендритах пациент-специфичных нейронов может быть связано с нарушением гомеостаза кальция

Дендритные шипики представляют собой специализированные структуры, отходящие от отростков нейронов, на которых формируются возбуждающие синаптические контакты, а потеря дендритных шипиков коррелирует с утратой синаптической функции (Herms, Dorostkar, 2016). Таким образом, причиной нейродегенеративных заболеваний является не только непосредственная гибель нейронов, но и уменьшение количества шипиков на дендритах, что приводит к нарушению синаптической передачи (Herms, Dorostkar, 2016).

Мы наблюдали уменьшение количества шипиков на дендритах пациент-специфичных и большинства генетически модифицированных нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*. В генетически модифицированных нейронах плотность шипиков на 1 мкм длины дендрита уменьшалась в 2 раза по сравнению с контролем (Рис. 22). Ранее уменьшение плотности шипиков при БХ было продемонстрировано как на мышинных моделях (Bulley et al., 2012), так и на материале больных пациентов (Graveland et al., 1985; Ferrante et al., 1991). Эти исследования позволили предположить, что причиной деградации шипиков может быть накопление в них белковых агрегатов (Li et al., 2001), а также нарушение внутриклеточного транспорта в отростках нейронов (Herms, Dorostkar, 2016). В то же время, публикуется всё больше работ, указывающих на то, что нарушение строения и уменьшение количества шипиков вызвано дисбалансом гомеостаза кальция в нервных клетках (Wu et al., 2016). Известно, что кальций играет важную роль в полимеризации микротрубочек. При экспериментальной стимуляции

выхода кальция из кальциевого депо ЭПР в нейронах гиппокампа была зарегистрирована деполимеризация микротрубочек в шипиках, приводящая к их деградации (Pchitskaya et al., 2022). Согласно данным наших коллег, в анализируемых нами пациент-специфичных нейронах был зафиксирован увеличенный ток кальция через депо-управляемые кальциевые каналы (Nekrasov et al., 2016), что может запускать тот же механизм.

Помимо уменьшения числа шипиков на дендритах, дисфункция синаптической передачи может быть обусловлена нарушением структурной организации синапса. Пресинаптическое окончание в норме содержит большое количество регулярно расположенных схожих по размеру мелких синаптических везикул. Проведенное нами исследование синапсов нейронов с трансгенной встройкой 69 CAG повторов продемонстрировало сниженное число, вариации размера и нерегулярное расположение синаптических везикул (Рис. 20, 22). Это согласуется с результатами других ультраструктурных исследований, проведенных на мышинных моделях БХ, продемонстрировавших уменьшение числа синаптических пузырьков и аномальное строение мембранных органелл в аксонах нейронов при БХ (Li et al., 1999; Li et al., 2001). Таким образом, наблюдаемое как нами, так и другими авторами нарушение организации синапсов может быть следствием дефицита аксонального транспорта и представлять собой серьезное невропатологическое событие, лежащее в основе селективной гибели средних шипиковых нейронов полосатого тела при БХ.

4.1.5. Возможная роль ингибитора кальциевых каналов EYP4593 в улучшении морфологии митохондрий и аутолизосом в пациент-специфичных нейронах

Недавние исследования показали, что один из основных сигнальных путей Ca^{2+} , депо-управляемый вход Ca^{2+} (SOCE), значительно повышен при БХ (Zhang et al., 2015). Нашими коллегами из Института общей генетики РАН на пациент-специфичных нейронах линии MA2 также был

продемонстрирован усиленный кальциевый ток через эти каналы (Nekrasov et al., 2016). Высказано предположение о том, что фармакологическое ингибирование nSOCE может быть потенциальным способом блокирования нейродегенерации (Wu et al., 2011). На сегодняшний день уже несколько ингибиторов SOCE были протестированы на моделях БХ. Одним из таких ингибиторов является 6-амино-4-(4-феноксифенетиламино)хиназолин (EVP4593) (Wu et al., 2011), применение которого нормализовало моторные функции у мух, моделирующих БХ, а также оказывало нейропротекторное действие в культуре средних шипиковых нейронов мышей линии YAC128 (Wu et al., 2011).

В своей работе мы впервые исследовали ультраструктурную организацию нейронов человека с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* после их инкубации с EVP4593 (Рис.10). В обработанных этим препаратом нейронах было зарегистрировано уменьшение количества дефектных митохондрий и аутолизосом, что было подтверждено нашими коллегами с помощью проточной цитометрии (Nekrasov et al., 2016). Таким образом, нормализация уровня Ca^{2+} в нейронах способствовала восстановлению функций и численной плотности митохондрий и аутолизосом (Рис. 11). Эти данные свидетельствуют о значительном влиянии повышенной концентрации кальция на нарушения морфологии органелл, а нормализация её уровня в клетке способствует восстановлению их функционирования.

4.2. Увеличение числа CAG повторов в гене *HTT* и усиление проявления ультраструктурных нарушений в генетически модифицированных нейронах и клетках НЕК293

Использование трёх различных клеточных моделей с разным числом повторов позволило нам произвести сравнительный анализ и выявить не только сходство морфологических нарушений, характерных для клеток с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*, но и продемонстрировать

различия структурных дефектов в клетках, возникающие с ростом количества этих повторов.

4.2.1. Связь увеличения до 69 числа CAG повторов в гене *HTT* в генетически модифицированных нейронах с появлением нарушений структурной организации дендритов, шипиков и синапсов

Известно, что накопление аутофагических везикул может свидетельствовать о нарушении процесса аутофагии и клеточной гибели (Mahapatra et al., 2021). При исследовании популяции генетически модифицированных нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT*, нами было зарегистрировано присутствие нейронов с признаками деградации, что не было отмечено в культурах пациент-специфичных нейронов с 42 и 47 повторами. Подобные клетки составляли около 14% от всех клеток в культуре и содержали большое количество крупных дефектных аутолизосом и остаточных телец (Рис. 15). Присутствие большого количества крупных светлых вакуолей ранее было описано при БХ, однако авторы расходятся в интерпретации их происхождения. Так Мао и др. (2016) считают, что эти вакуоли представляют собой раздувшиеся цистерны ЭПР (Мао et al., 2016), тогда как Мартинес-Висенте с соавт., использовавшие меченные золотом антитела к LC3 (убиквитин-подобный белок, который вовлечён в формирование аутофагосом) полагают, что светлые вакуоли являются аутолизосомами (Martinez-Vicente et al., 2010). Следует отметить, что некоторые авторы, изучающие культуру нейронов, экспрессирующих mHtt, наблюдали различные варианты клеточной гибели, как апоптоз и некроз, так и гибель в результате разрыва крупных вакуолей (Мао et al., 2016). Таким образом, можно предполагать, что клетки, в которых мы наблюдаем накопление большого числа крупных аутолизосом с разрывами мембран, являются потенциально гибнущими.

Согласно нашим данным, около 16% нейронов в культуре генетически модифицированных клеток с 69 CAG повторами в гене *HTT* существенно отличались от остальных и имели патологическую организацию дендритов и

шипиков (Рис. 15). Дендриты имели вид многочисленных тонких и широких разветвленных отростков, а шипики были гипертрофированы, имели разную форму и размеры (Рис. 19). В отличие от большинства нейронов, у атипичных была зарегистрирована повышенная плотность расположения шпиков по длине дендрита (Рис. 22). Показано, что ключевую роль в формировании шпиков играет актиновый цитоскелет (Dent et al., 2011). Множество различных белков в цитоплазме связываются с актином и играют роль в поддержании структуры дендритного шипика. Так, например, актинин-2 представляет собой сшиватель актиновых филаментов, локализующийся в дендритных шипиках. При его сверхэкспрессии возрастала длина и плотность дендритных выпячиваний у нейронах гиппокампа в культуре (Nakagawa et al., 2004), в то же время нокдаун также приводил к увеличению плотности шпиков на дендритах нейронов гиппокампа крыс (Hodges et al., 2014). Поскольку было продемонстрировано взаимодействие актинина-2 с Htt, можно предполагать, что mHtt может нарушать функцию этого белка. Кроме того, актиновый цитоскелет, в свою очередь, чувствителен к изменению гомеостаза кальция (Dent et al., 2011). Важную функцию в перемещении ионов Ca^{2+} в шипиках выполняет эндоплазматический ретикулум, стресс и функциональные нарушения которого при БХ продемонстрированы как в нашем исследовании, так и в работах других авторов (Красковская и др., 2021). Согласно многим исследованиям, именно нарушение гомеостаза и дисрегуляция пространственно-временной динамики кальция в нейронах и особенно в дендритных шипиках негативно влияют на функцию нейронов и стимулируют развитие БХ и других неродегенеративных заболеваний (Wu et al., 2011; Wu et al., 2016; Czeredys, 2020).

4.2.2. Возможные причины атипичного слипания мембран шероховатого ЭПР в мутантных клетках НЕК293 при увеличении числа CAG повторов до 100-150 в гене *HTT*

Согласно исследованиям развития БХ на мышинных моделях, а также по результатам математического моделирования развития БХ, проявление моторных симптомов у пациентов происходит, когда количество CAG повторов превышает 115 в достаточном количестве пермиссивных клеток (Ansved et al., 1998; Kaplan et al., 2007). Одной из задач нашего исследования было изучить структурные нарушения в клетках с большим числом CAG повторов. Получить нейрональную модель со 100-150 CAG повторами является технически сложной задачей, поэтому наши коллеги предложили для исследования клетки НЕК293 со встройкой 100- 150 CAG повторов в ген *HTT*. Проведённый нами ультраструктурный анализ выявил дефекты в организации компонентов трёх функциональных клеточных систем: ЭПР, митохондрий и аутолизосом, схожие с теми, что наблюдались в мутантных пациент-специфичных и генетически модифицированных нейронах с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT*. Следует отметить, что клетки НЕК293 в контроле имели меньшее количество аутолизосом по сравнению с нейронами, однако, в клетках мутантных субклонов со 150 CAG повторами их число увеличивалось в 3 раза, что согласуется с данными по нейронам (Рис. 9, 21, 34). При этом нарушения оболочки наблюдались уже у мелких аутолизосом размером до 0,6 мкм (Рис. 28.) Это может указывать на нарушение процесса аутофагии на более ранней стадии, чем в мутантных нейронах, что, по данным некоторых авторов, может быть вызвано нарушением состава мембран аутолизосом, (Appelqvist et al., 2011; Ullio et al., 2012).

В клетках клона F1 линии НЕК293 FT со 150 CAG повторами мы впервые выявили многослойные мембранные структуры в цитоплазме (Рис. 32). Ранее присутствие подобных структур в клетках при нейродегенеративных заболеваниях не было описано. Интересно, что

увеличение уровня экспрессии белка VAPB дикого типа, мутация VAPB-P56S в котором связана с одной из наследственных форм БАС, сопровождалась присутствием плотно скрученных в концентрические «рулоны» стопок ЭПР. Однако этого не наблюдалось при экспрессии мутантного белка (Kuijpers et al., 2014).

В целом ряде работ описано формирование плотных мембранных скоплений различной архитектуры как гладкими, так и шероховатыми мембранами ЭПР в разных типах клеток (Chin et al., 1982; Yamamoto et al., 1996). Эти структуры могут иметь вид упорядоченных скоплений трубочек и цистерн с гексагональной или кубической симметрией (Chin et al., 1982; Anderson et al., 1983; Yamamoto et al., 1996), а также свёрнутых в концентрические «рулоны» стопок мембран (Koning et al., 1996). Стопки мембран ЭПР наблюдались в разнообразных тканях (King et al., 1974), в том числе в тестикулярных интерстициальных клетках (Carr, Carr, 1962; Christensen, Fawcett, 1966), адренкортикальных клетках (Nickerson, Curtis, 1969), клетках меланомы (Hu, 1971), клетках передней доли гипофиза (Dubois, Girod, 1971), и дугообразных нейронах гипоталамуса (King et al., 1974).

Формирование многослойных мембранных структур было отмечено при изменении уровня экспрессии мембранных белков ЭПР. Например, при РНК-интерференции экспрессии белка Yip1A, играющего роль в формировании транспортных везикул ЭПР, премещающихся к АГ (Dykstra et al., 2010). При этом снижение экспрессии других факторов, вовлеченных в этот процесс транспорта, не вызывали подобного эффекта (Dykstra et al., 2010). Сверхэкспрессия белка TMEM170A сопровождалась формированием в цитоплазме многослойных мембранных структур ЭПР и даже налипанием цистерн на оболочку ядра (Christodoulou et al., 2016). Этот белок играет очень важную роль в динамическом ремоделировании структуры ЭПР, а именно изменению формы плоских цистерн на тубулы и наоборот (Christodoulou et al., 2016). Повышение уровня экспрессии нескольких различных заякоренных

в мембране белков ЭПР, включая HMG-CoA-редуктазу (Chin et al., 1982), микросомальную альдегиддегидрогеназу (Yamamoto et al., 1996), цитохром b5 (Pedrazzini et al., 2000), инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор (Takei et al., 1994), VAP-B с белком-партнером Nir2 (Amarilio et al., 2005) также приводит к формированию стопок мембран ЭПР. Во многих, если не во всех случаях, укладка мембран, по-видимому, обусловлена способностью цитоплазматического домена сверхэкспрессированного белка взаимодействовать с самим собой, фактически «застегивая» соприкасающиеся мембраны вместе, по типу застёжки молнии (Dykstra et al., 2010). Показано, что даже взаимодействия с низким сродством между закрепленными в мембране мономерами GFP было достаточно, чтобы стимулировать образование стопочных структур, до тех пор, пока мономеры присутствовали в достаточно высоких концентрациях (Snapp et al., 2003). Таким образом, общий механизм для предотвращения нежелательного слипания может вносить значительный вклад в морфогенез и стресс ЭПР (Dykstra et al., 2010). Роль mHtt во взаимодействии и регуляции мембранных белков ЭПР ещё только предстоит определить.

Стоит отметить, что схожие многослойные структуры ЭПР в цитоплазме, а также нарушение строения ядерной оболочки и неправильная форма ядер были продемонстрированы на клетках дрожжей с нарушенным синтезом мембранных фосфолипидов вследствие делеции гена дрожжевого гомолога белка липина, PAN1, или его регуляторов (Siniossoglou et al., 1998; Tange et al., 2002; Santos-Rosa et al., 2005). Липин - консервативная фосфатаза, которая является основным участником процесса синтеза фосфолипидов, она превращает фосфатидную кислоту в диацилглицерин (ДАГ) (Carman, Han, 2006; Siniossoglou, 2013). У многоклеточных животных липин находится в точке разветвления пути синтеза фосфолипидов, где фосфатидилхолин и фосфатидилэтанолламин синтезируются из продукта липина ДАГ, а фосфатидилинозитол из субстрата липина фосфатидной кислоты (Carman, Han, 2006; Lagace, Ridgway, 2013; Siniossoglou, 2013). В

ЭПР фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин составляют более 70% от общего количества фосфолипидов, тогда как количество фосфатидилинозитола менее 10% (Meer Van et al., 2008). Предполагается, что у многоклеточных снижение активности липина приводит к сдвигу фосфолипидного баланса с продукции ДАГ и основных фосфолипидов фосфотидилхолина и фосфатидилэтаноламина в сторону продукции фосфатидилинозитола. Липин заякорен в мембране ЭПР, однако растворимый липин также выполняет функцию транскрипционного фактора, регулирующего экспрессию белков, вовлеченных в биосинтез фосфолипидов (Siniossoglou, 2013).

Липиновая активность и локализация регулируется многосайтовым фосфорилированием посредством Cdk1 и mTORC1 (Carman, Han, 2011; Siniossoglou, 2013), которые негативно регулируют активность липинов (Eaton et al., 2013). На эмбрионах *C. elegans* и клетках HeLa было показано, что ингибирование CNEP-1, который активирует липин (а его ингибирование, соответственно, снижает активность липина), приводит к нарушению баланса синтеза фосфолипидов и увеличению синтеза фосфатидилинозитола, при этом наблюдались эктопические налипания цистерн ЭПР на ядерную оболочку (Bahmanyar et al., 2014). Таким образом, причиной атипичного слипания мембран в клетках HEK293 с высоким (100-150) числом CAG повторов в гене *HTT* может быть нарушенный уровень фосфолипидов в мембранах стрессированного ЭПР. Этот вывод согласуется с ранее описанными нарушениями липидного обмена у пациентов при БХ, они теряют массу тела (VanDerBurg et al., 2017), а в ткани их мозга снижен уровень холестерина и жирных кислот (Block et al., 2010). Таким образом, причиной атипичного слипания мембран в клетках HEK293 с высоким (100-150) числом CAG повторов в гене *HTT* может быть нарушенный уровень фосфолипидов в мембранах стрессированного ЭПР.

Связь между mHtt и обменом липидов может быть действительно опосредована липином через mTOR (Peterson et al., 2011). mTOR

фосфорилирует липин, а при снижении активности mTOR дефосфорилированный липин транспортируется в ядро, где конкурирует с транскрипционными факторами семейства SREBP (**S**terol **r**egulatory **e**lement-**b**inding **p**rotein) (Peterson et al., 2011). Транскрипционные факторы семейства SREBP активируют экспрессию генов множества ферментов, участвующих в биосинтезе липидов. Липин вытесняет SREBP и подавляет экспрессию его мишеней (Peterson et al., 2011). При этом показано, что mHtt снижает активность mTOR, включая его в агрегаты (Ravikumar et al., 2004). Таким образом, вероятно, и достигается описанное ранее снижение уровня ферментов, вовлеченных в биосинтез липидов (Ravikumar et al., 2004). Возможно, более подробное изучение поведения липина в клетках с мутацией в гене *HTT* поможет понять каким образом нарушается липидный обмен при БХ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования нейродегенеративных заболеваний тесно связаны с разработкой клеточных моделей, полученных как с использованием клеточного материала от пациентов, так и созданных с помощью методов редактирования генома (Zhang et al., 2016). Изучение ультраструктурных нарушений в строении нейронов с увеличенным числом CAG повторов в гене *HTT* является одним из подходов в исследовании механизмов развития этого серьезного нейродегенеративного заболевания. Используемый в настоящей работе комплексный подход, включающий сравнительный морфометрический и электронно-микроскопический анализ нарушений структурно-функциональной организации нейронов пациент-специфичных и генетически модифицированных культур, а также клеток НЕК293, существенно отличающихся по числу CAG повторов в гене *HTT* (42-47, 69 и 150, соответственно), позволил выявить новые детальные подробности в развитии БХ.

Впервые показано, что все исследованные мутантные клетки, включая пациент-специфичные и генетически модифицированные нейроны и клетки НЕК293, характеризуются схожими нарушениями функциональной морфологии 3-х типов клеточных органелл включая: стресс гладкого и шероховатого ЭПР (везикуляция мембран), что, вероятно, обусловлено нарушением везикулярного транспорта; дефекты митохондрий (оболочек, матрикса и крист), возможно вследствие увеличения контактов ЭПР и митохондрий, в результате чего происходит нарушение гомеостаза кальция; дефекты аутолизосом (нарушение целостности окружающей мембраны).

Морфометрический анализ позволил впервые продемонстрировать улучшение морфологии митохондрий и аутолизосом в пациент-специфичных средних шипиковых нейронах после их инкубации с ингибитором депозитивных кальциевых каналов EVR4593, что ещё раз указывает на важную роль нарушения кальциевого гомеостаза в патогенезе БХ.

Установлено, что с увеличением до 69 числа CAG повторов в гене *HTT* в популяции генетически модифицированных нейронов появляются гибнущие клетки, а также атипичные нейроны с существенным нарушением строения дендритов, синапсов, и шипиков, численная плотность которых на дендритах увеличивалась, в отличие от снижения числа шипиков на дендритах пациент-специфичных нейронов с 42-47 CAG повторами в гене *HTT*. Это указывает на корреляцию между ростом числа CAG повторов в гене *HTT* и увеличением патологического действия mHtt на структурно-функциональную организацию нейронов.

Интересно, что в данной работе впервые выявлено слипание цистерн ЭПР и формирование 4-х слойных структур в цитоплазме клеток HEK293, содержащих 150 CAG повторов в гене *HTT*. Высказано предположение о том, что возможной причиной подобного атипичного взаимодействия мембран могут быть нарушения в составе и функции белков ЭПР.

ВЫВОДЫ

1. Нейроны пациент-специфичных и генетически модифицированных культур, содержащие увеличенное число CAG повторов (42-47, и 69, соответственно) в гене *HTT*, а также генетически модифицированные клетки НЕК293, содержащие 100-150 CAG повторов, имеют схожие патологические изменения гладкого и шероховатого ЭПР (накопление мелких везикул вблизи цистерн), митохондрий (нарушение оболочки, деформация крист и разрежение матрикса), и аутолизосом (нарушение целостности окружающей мембраны).

2. Впервые продемонстрировано присутствие в популяции нейронов с 69 CAG повторами в гене *HTT* атипичных нейронов с дефектной организацией дендритов, шипиков и синапсов, а также гибнущих нейронов, не наблюдавшихся в пациент-специфичных культурах с 42-47 CAG повторами. Это свидетельствует о связи между ростом числа CAG повторов в гене *HTT* и увеличением степени патологического действия мутантного белка Htt на функциональную организацию компонентов нейронов, участвующих в передаче нервного сигнала

3. Генетически модифицированные клетки НЕК293 со 100-150 CAG повторами в гене *HTT* характеризуются присутствием в цитоплазме четырёхслойных мембранных структур, формирующихся при атипичном взаимном слипании двух цистерн шероховатого ЭПР, что может свидетельствовать о нарушении свойств фосфолипидов, входящих в состав этих мембран.

4. Ингибирование депо-зависимых кальциевых каналов с использованием EVR4593 приводит к снижению частоты встречаемости митохондрий со структурными нарушениями, снижает количество аутолизосом в пациент-специфичных нейронах с 47 CAG повторами.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdrakhmanov A., Gogvadze V., Zhivotovsky B. To eat or to die: deciphering selective forms of autophagy // Trends Biochem. Sci. 2020. Т. 45. № 4. С. 347–364.
2. Alberch J. Intrastratial grafting of a GDNF-producing cell line protects striatonigral neurons from quinolinic acid excitotoxicity in vivo // Eur. J. Neurosci. - 1999. - Т. 11. - № 1. - С. 241–249.
3. Alimohamadi H., Bell M. K., Halpain S., Rangamani P. Mechanical principles governing the shapes of dendritic spines // Front. Physiol. - 2021. - Т. 12. - С. 657074.
4. Alkanli S. S., Alkanli N., Ay A., Albeniz I. CRISPR/Cas9 mediated therapeutic approach in Huntington's disease // Mol. Neurobiol. 2023. Т. 60. № 3. С. 1486–1498.
5. Amarilio R., Ramachandran S., Sabanay H., Lev S. Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction // J. Biol. Chem. - 2005. - Т. 280. - № 7. - С. 5934–5944.
6. Anderson R. G. W., Orci L., Brown M. S. Ultrastructural analysis of crystalloid endoplasmic reticulum in UT-1 cells and its disappearance in response to cholesterol // J. Cell Sci. - 1983. - Т. 63. - № 1. - С. 1–20.
7. Anglade P. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease // Histol. Histopathol. - 1997. - Т. 12. - № 1.
8. Ansved T., Lundin A., Anvret M. Larger CAG expansions in skeletal muscle compared with lymphocytes in Kennedy disease but not in Huntington disease // Neurology. - 1998. - Т. 51. - № 5. - С. 1442–1444.
9. Appelqvist H., Nilsson C., Garner B., Brown A. J., Kågedal K., Öllinger K. Attenuation of the lysosomal death pathway by lysosomal cholesterol accumulation // Am. J. Pathol. - 2011. - Т. 178. - № 2.
10. Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E. S., Segal M. R., Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of

neuronal death // *Nature*. - 2004. - T. 431. - № 7010. - C. 805–810.

11. Bahmanyar S., Biggs R., Schuh A. L., Desai A., Müller-Reichert T., Audhya A., Dixon J. E., Oegema K. Spatial control of phospholipid flux restricts endoplasmic reticulum sheet formation to allow nuclear envelope breakdown // *Genes Dev*. - 2014. - T. 28. - № 2. - C. 121–126.

12. Bakels H. S. Juvenile-Onset Huntington Disease Pathophysiology and Neurodevelopment : A Review Neuropathology and Imaging // *Mov. Disord*. - 2022. - T. 37. - № 1. - C. 16–24.

13. Barron J. C., Hurley E. P., Parsons M. P. Huntingtin and the Synapse // *Front. Cell. Neurosci*. - 2021. - T. 15. - C. 689332.

14. Bayram-weston Z., Torres E. M., Jones L., Dunnett S. B., Brooks S. P. Light and electron microscopic characterization of the evolution of cellular pathology in the Hdh (CAG) 150 Huntington's disease knock-in mouse // *Brain Res. Bull*. - 2012. - T. 88. - № 2–3. - C. 189–198.

15. Behr J. P. The proton sponge: A trick to enter cells the viruses did not exploit // *Chimia*. , 1997. C. 34–36.

16. Bergonzoni G., Döring J., Biagioli M. D1R- and D2R-Medium-Sized Spiny Neurons Diversity: Insights Into Striatal Vulnerability to Huntington's Disease Mutation // *Front. Cell. Neurosci*. - 2021. - T. 15. - C. 628010.

17. Bessert D. A., Gutridge K. L., Dunbar J. C., Carlock L. R. The identification of a functional nuclear localization signal in the Huntington disease protein // *Mol. Brain Res*. - 1995. - T. 33. - № 1. - C. 165–173.

18. Bezprozvanny I. Calcium signaling and neurodegenerative diseases // 2009. - T. 15. - № 3. - C. 89–100.

19. Block R. C., Dorsey E. R., Beck C. A., Brenna J. T., Shoulson I. Altered cholesterol and fatty acid metabolism in Huntington disease // *J. Clin. Lipidol*. - 2010. - T. 4. - № 1. - C. 17–23.

20. Boland B., Kumar A., Lee S., Platt F. M., Wegiel J., Yu W. H., Nixon R. A. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: Relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease // *J. Neurosci*. - 2008. - T. 28. - № 27.

- C. 6926–6937.

21. Bousquet J., Meunier J. M. Organotypic culture, on natural and artificial media, of fragments of the adult rat hypophysis // *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* - 1962. - T. 156. - C. 65–67.

22. Boustany R. M. N. Lysosomal storage diseases - The horizon expands // *Nat. Rev. Neurol.* - 2013. - T. 9. - № 10. - C. 583–598.

23. Brandstaetter H., Kruppa A. J., Buss F. Huntingtin is required for ER-to-Golgi transport and for secretory vesicle fusion at the plasma membrane // *Dis. Model. Mech.* - 2014. - T. 7. - C. 1335–1340.

24. Bulley S. J., Drew C. J. G., Morton A. J. Direct visualisation of abnormal dendritic spine morphology in the hippocampus of the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease // *J. Huntingtons. Dis.* - 2012. - T. 1. - № 2. - C. 267–273.

25. Calì T., Ottolini D., Negro A., Brini M. α -synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions // *J. Biol. Chem.* - 2012. - T. 287. - № 22. - C. 17914–17929.

26. Calì T., Ottolini D., Negro A., Brini M. Enhanced parkin levels favor ER-mitochondria crosstalk and guarantee Ca^{2+} transfer to sustain cell bioenergetics // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* - 2013. - T. 1832. - № 4. - C. 495–508.

27. Carman G. M., Han G. S. Roles of phosphatidate phosphatase enzymes in lipid metabolism // *Trends Biochem. Sci.* - 2006. - T. 31. - № 12. - C. 694–699.

28. Carman G. M., Han G. S. Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces Cerevisiae* // *Annu. Rev. Biochem.* - 2011. - T. 80. - C. 889–883.

29. Carr I., Carr J. Membranous whorls in the testicular interstitial cell // *Anat. Rec.* - 1962. - T. 144. - № 2. - C. 143–147.

30. Chen X., He E., Su C., Zeng Y., Xu J. Huntingtin-associated protein 1-associated intracellular trafficking in neurodegenerative diseases // *Front. Aging*

Neurosci. 2023. T. 15. C. 1100395.

31. Cheng X. T., Zhou B., Lin M. Y., Cai Q., Sheng Z. H. Axonal autophagosomes recruit dynein for retrograde transport through fusion with late endosomes // *J. Cell Biol.* - 2015. - T. 209. - № 3. - C. 377–386.

32. Chin D. J., Luskey K. L., Anderson R. G., Faust J. R., Goldstein J. L., Brown M. S. Appearance of crystalloid endoplasmic reticulum in compactin-resistant Chinese hamster cells with a 500-fold increase in 3-hydroxy-e-methylglutaryl-coenzyme A reductase // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1982. - T. 79. - № 9. - C. 1185–1189.

33. Cho I. K., Easley C. A., Chan A. W. S. Suppression of trinucleotide repeat expansion in spermatogenic cells in Huntington's disease // *J. Assist. Reprod. Genet.* - 2022. - T. 39. - № 10. - C. 2413–2430.

34. Christensen A. K., Fawcett D. W. The fine structure of testicular interstitial cells in mice // *Am. J. Anat.* - 1966. - T. 118. - № 2. - C. 551–571.

35. Christodoulou A., Santarella-mellwig R., Santama N., Mattaj I. W. Transmembrane protein TMEM170A is a newly discovered regulator of ER and nuclear envelope morphogenesis in human cells // *J. Cell Sci.* - 2016. - T. 129. - C. 1552–1565.

36. Chuhma N., Oh S. J., Rayport S. The dopamine neuron synaptic map in the striatum // *Cell Rep.* - 2023. - T. 42. - № 3.

37. Cicchetti F., Soulet D., Freeman T. B. Neuronal degeneration in striatal transplants and Huntington's disease: Potential mechanisms and clinical implications // *Brain.* - 2011. - T. 134. - № 3. - C. 614–652.

38. Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X., Jiang W., Marraffini L. A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science.* - 2013. - T. 339. - № 6121. - C. 819–823.

39. Cooper J. K., Schilling G., Peters M. F., Herring W. J., Sharp A. H., Kaminsky Z., Masone J., Khan F. A., Delanoy M., Borchelt D. R., Dawson V. L., Dawson T. M., Ross C. A. Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell

culture // *Hum. Mol. Genet.* - 1998. - T. 7. - № 5. - C. 783–790.

40. Coyle J. T., Schwarcz R. Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea // *Nature.* - 1976. - T. 263. - № 5574. - C. 244–246.

41. Crain S. M. Development of «Organotypic» Bioelectric Activities in Central Nervous Tissues During Maturation in Culture // *Int. Rev. Neurobiol.* - 1966. - T. 9. - № C. - C. 1–43.

42. Csobonyeiova M., Polak S., Danisovic L. Recent overview of the use of iPSCs huntington's disease modeling and therapy // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. T. 21. № 6. C. 2239.

43. Cui L., Jeong H., Borovecki F., Parkhurst C. N., Tanese N., Krainc D. Transcriptional Repression of PGC-1 α by Mutant Huntingtin Leads to Mitochondrial Dysfunction and Neurodegeneration // *Cell.* - 2006. - T. 127. - № 1. - C. 59–69.

44. Czeredys M. Dysregulation of Neuronal Calcium Signaling via Store-Operated Channels in Huntington's Disease // *Front. Cell Dev. Biol.* - 2020. - T. 8. - C. 611735.

45. Davies C. A., Mann D. M. A., Sumpter P. Q., Yates P. O. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease // *J. Neurol. Sci.* - 1987. - T. 78. - № 2. - C. 151–164.

46. Davies S. W., Beardsall K., Turmaine M., Difiglia M., Aronin N., Bates G. P. Are neuronal intranuclear inclusions the common neuropathology of triplet-repeat disorders with polyglutamine-repeat expansions ? // 1998. - T. 351. - C. 131–133.

47. Davies S. W., Turmaine M. Formation of Neuronal Intranuclear Inclusions Underlies the Neurological Dysfunction in Mice Transgenic for the HD Mutation. , 1997. 537–548 c.

48. delRey N. L. G., García-Cabezas M. Á. Cytology, architecture, development, and connections of the primate striatum: Hints for human pathology

// Neurobiol. Dis. 2023. T. 176. C. 105945.

49. Deng H., Dodson M. W., Huang H., Guo M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 2008. - T. 105. - № 38. - C. 14503–14508.

50. Dent E. W., Merriam E. B., Hu X. The dynamic cytoskeleton: Backbone of dendritic spine plasticity // Curr. Opin. Neurobiol. - 2011. - T. 21. - № 1. - C. 175–181.

51. DeRidder I., Kerkhofs M., Lemos F. O., Loncke J., Bultynck G., Parys J. B. The ER-mitochondria interface, where Ca²⁺ and cell death meet // Cell Calcium. - 2023. - T. 112. - C. 102743.

52. DeVos K. J., Mórotz G. M., Stoica R., Tudor E. L., Lau K. F., Ackerley S., Warley A., Shaw C. E., Miller C. C. J. VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis // Hum. Mol. Genet. - 2012. - T. 21. - № 6. - C. 1299–1233.

53. DiFiglia M., Sapp E., Chase K., Schwarz C., Meloni A., Young C., Martin E., Vonsattel J., Carraway R., Reeves S. A., Boyce F. M., Aronin N. Huntingtin Is a Cytoplasmic Protein Associated with Vesicles in Human and Rat Brain Neurons // Neuron. - 1995. - T. 14. - C. 1075–1081.

54. DiFiglia M., Sapp E., Chase K. O., Davies S. W., Bates G. P., Vonsattel J. P., Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain // Science (80-.). - 1997. - T. 277. - № 5334. - C. 1990–1993.

55. DiMauro S., Schon E. A. Mitochondrial disorders in the nervous system // Annu. Rev. Neurosci. - 2008. - T. 31. - C. 91–123.

56. Diógenes M. J., Dias R. B., Rombo D. M., Vicente Miranda H., Maiolino F., Guerreiro P., Näsström T., Franquelim H. G., Oliveira L. M. A., Castanho M. A. R. B., Lannfelt L., Bergström J., Ingelsson M., Quintas A., Sebastião A. M., Lopes L. V., Outeiro T. F. Extracellular alpha-synuclein oligomers modulate synaptic transmission and impair LTP via NMDA-receptor

activation // *J. Neurosci.* - 2012. - T. 32. - № 34. - C. 11750–11762.

57. DiTella S., Monaco M. Ri. Lo, Petracca M., Zinzi P., Solito M., Piano C., Calabresi P., Silveri M. C., Bentivoglio A. R. Beyond the CAG triplet number: exploring potential predictors of delayed age of onset in Huntington's disease // *J. Neurol.* - 2022. - T. 269. - № 12. - C. 6634–6640.

58. Dubois P., Girod C. Formations lamellaires concentriques dans des cellules antéhypophysaires chez le hamster doré // *Zeitschrift für Zellforsch. und Mikroskopische Anat.* - 1971. - T. 115. - № 2. - C. 196–211.

59. Dugger B. N., Dickson D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases // 2017. - C. 1–22.

60. Dykstra K. M., Pokusa J. E., Suhan J., Lee T. H. Yip1A structures the mammalian endoplasmic reticulum // *Mol. Biol. Cell.* - 2010. - T. 21. - № 9. - C. 1556–1568.

61. Eaton J. M., Mullins G. R., Brindley D. N., Harris T. E. Phosphorylation of lipin 1 and charge on the phosphatidic acid head group control its phosphatidic acid phosphatase activity and membrane association // *J. Biol. Chem.* - 2013. - T. 288. - № 14. - C. 9933–9945.

62. Ehrnhoefer D. E., Sutton L., Hayden M. R. Small changes, big impact: Posttranslational modifications and function of huntingtin in huntington disease // *Neuroscientist.* - 2011. - T. 17. - № 5. - C. 475–492.

63. Engelender S., Sharp A. H., Colomer V., Tokito M. K., Lanahan A., Worley P., Holzbaur E. L. F., Ross C. A. Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150(Glued) subunit of dynactin // *Hum. Mol. Genet.* - 1997. - T. 6. - № 13. - C. 2205–2212.

64. Farshim P. P., Bates G. P. Mouse models of Huntington's disease // *Huntington's Dis.* - 2018. - C. 97–120.

65. Ferrante R. J., Kowall N. W., Richardson E. P. Proliferative and degenerative changes in striatal spiny neurons in Huntington's disease: A combined study using the section-Golgi method and calbindin D28k immunocytochemistry // *J. Neurosci.* - 1991. - T. 11. - № 12. - C. 3877–3887.

66. Filadi R., Theurey P., Pizzo P. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease : Molecules , functions and significance // *Cell Calcium*. - 2017. - T. 62. - C. 1–15.
67. Filippone A., Esposito E., Mannino D., Lyssenko N., Praticò D. The contribution of altered neuronal autophagy to neurodegeneration // *Pharmacol. Ther.* 2022. T. 238. C. 108178.
68. Filosto M., Scarpelli M., Cotelli M. S., Vielmi V., Todeschini A., Gregorelli V., Tonin P., Tomelleri G., Padovani A. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases // *J. Neurol.* - 2011. - T. 258. - № 10. - C. 1763–1774.
69. Folger A., Wang Y. The Cytotoxicity and Clearance of Mutant Huntingtin and Other Misfolded Proteins // *Cells*. - 2021. - T. 10. - № 11. - C. 2835.
70. Fowler P. C., Garcia-Pardo M. E., Simpson J. C., O’Sullivan N. C. Neurodegeneration: The Central Role for ER Contacts in Neuronal Function and Axonopathy, Lessons From Hereditary Spastic Paraplegias and Related Diseases // *Front. Neurosci.* - 2019. - T. 13. - C. 1051.
71. Frake R. A., Ricketts T., Menzies F. M., Rubinsztein D. C. Autophagy and neurodegeneration // *J. Clin. Invest.* - 2015. - T. 125. - № 1. - C. 65–74.
72. Franco-Iborra S., Plaza-Zabala A., Montpeyo M., Sebastian D., Vila M., Martinez-Vicente M. Mutant HTT (huntingtin) impairs mitophagy in a cellular model of Huntington disease // *Autophagy*. - 2021. - T. 17. - № 3. - C. 672–689.
73. Fu M., Nirschl J. J., Holzbaur E. L. F. LC3 Binding to the scaffolding protein jip1 regulates processive dynein-driven transport of autophagosomes // *Dev. Cell* 577. - 2014. - T. 29. - № 5. - C. 577–590.
74. Fusilli C. et al. Biological and clinical manifestations of juvenile Huntington’s disease: a retrospective analysis // *Lancet Neurol.* - 2018. - T. 17. - № 11. - C. 986–993.
75. Gao F., Shen X. Z., Jiang F., Wu Y., Han C. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute // *Nat. Biotechnol.* - 2016. - T. 34. - № 7. - C. 768–773.

76. Gauthier L. R., Charrin B. C., Borrell-Pagès M., Dompierre J. P., Rangone H., Cordelières F. P., Mey J. De, MacDonald M. E., Leßmann V., Humbert S., Saudou F. Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules // *Cell*. - 2004. - T. 118. - № 1. - C. 127–138.

77. Ghemrawi R. Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases // *Int. J. Mol. Sci.* - 2020. - T. 21. - № 6127. - C. 6127.

78. Gordon K., Clouaire T., Bao X. X., Kemp S. E., Xenophontos M., Las Heras J. I. De, Stancheva I. Immortality, but not oncogenic transformation, of primary human cells leads to epigenetic reprogramming of DNA methylation and gene expression // *Nucleic Acids Res.* - 2014. - T. 42. - № 6. - C. 3529–3541.

79. Gowrishankar S., Yuan P., Wu Y., Schrag M., Paradise S., Grutzendler J., Camilli P. De, Ferguson S. M. Massive accumulation of luminal protease-deficient axonal lysosomes at Alzheimer's disease amyloid plaques // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2015. - T. 112. - № 28. - C. E3699–E3708.

80. Graveland G. A., Williams R. S., Difiglia M. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease // *Science* (80-.). - 1985. - T. 227. - № 4688. - C. 770–773.

81. Grimm K., Zühlke C., Gerloff C., Zittel S. A case of Huntington's disease with two reduced penetrance alleles // *Clin. Neurol. Neurosurg.* - 2021. - T. 207. - C. 106733.

82. Guardia-Laguarta C., Area-Gomez E., Schon E. A., Przedborski S. A new role for α -synuclein in Parkinson's disease: Alteration of ER–mitochondrial communication // *Mov. Disord.* - 2015. - T. 30. - № 8. - C. 1026–1033.

83. Gutekunst C., Li S., Yi H., Mulroy J. S., Kuemmerle S., Jones R., Rye D., Ferrante R. J., Hersch S. M., Li X. Nuclear and Neuropil Aggregates in Huntington's Disease : Relationship to Neuropathology // *J. Neurosci.* - 1999. - T. 19. - № 7. - C. 2522–2534.

84. Hara T., Nakamura K., Matsui M., Yamamoto A., Nakahara Y., Suzuki-

Migishima R., Yokoyama M., Mishima K., Saito I., Okano H., Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice // *Nature*. - 2006. - T. 441. - № 7095. - C. 885–889.

85. Hedskog L., Pinho C. M., Filadi R., Rönnbäck A., Hertwig L., Wiehager B., Larssen P., Gellhaar S., Sandebring A., Westerlund M., Graff C., Winblad B., Galter D., Behbahani H., Pizzo P., Glaser E., Ankarcrona M. Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2013. - T. 110. - № 19. - C. 7916–7921.

86. Henry A. G., Aghamohammadzadeh S., Samaroo H., Chen Y., Mou K., Needle E., Hirst W. D. Pathogenic LRRK2 mutations, through increased kinase activity, produce enlarged lysosomes with reduced degradative capacity and increase ATP13A2 expression // *Hum. Mol. Genet.* - 2015. - T. 24. - № 21. - C. 6013–6028.

87. Herms J., Dorostkar M. M. Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases // *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* - 2016. - T. 11. - C. 221–250.

88. Hoffher G., Island M. L., Djian P. Purification of neuronal inclusions of patients with Huntington's disease reveals a broad range of N-terminal fragments of expanded huntingtin and insoluble polymers // *J. Neurochem.* - 2005. - T. 95. - № 1. - C. 125–136.

89. Holmberg M., Duyckaerts C., Dürr A., Cancel G., Gourfinkel-An I., Damier P., Faucheux B., Trottier Y., Hirsch E. C., Agid Y., Brice A. Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): A neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions // *Hum. Mol. Genet.* - 1998. - T. 7. - № 5. - C. 913–918.

90. Hoogeveen A. T., Willemsen R., Meyer N., Roolj K. E. d., Roos R. A. C., Ommen G. J. B. va., Galjaard H. Characterization and localization of the huntington disease gene product // *Hum. Mol. Genet.* - 1993. - T. 2. - № 12. - C. 2069–2073.

91. Hu F. Ultrastructural changes in the cell cycle of cultured melanoma cells // *Anat. Rec.* - 1971. - T. 170. - № 1. - C. 41–55.

92. Humphries K. M., Szweda L. I. Selective inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase: Reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal // *Biochemistry*. - 1998. - T. 37. - № 45. - C. 15835–15841.
93. Hwang S., Disatnik M., Mochly-rosen D. Impaired GAPDH-induced mitophagy contributes to the pathology of Huntington ' s disease // 2015. - T. 7. - № 10. - C. 1307–1326.
94. Jahreiss L., Menzies F. M., Rubinsztein D. C. The itinerary of autophagosomes: From peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes // *Traffic*. - 2008. - T. 9. - № 4. - C. 574–587.
95. Johri A., Chandra A. Connection lost, mam: Errors in er–mitochondria connections in neurodegenerative diseases // *Brain Sci*. - 2021. - T. 11. - № 11. - C. 1437.
96. Kanazawa I. How do neurons die in neurodegenerative diseases? // *Trends Mol. Med*. - 2001. - T. 7. - № 8. - C. 339–344.
97. Kaplan S., Itzkovitz S., Shapiro E. A universal mechanism ties genotype to phenotype in trinucleotide diseases // *PLoS Comput. Biol*. - 2007. - T. 3. - № 11. - C. e235.
98. Kegel K. B., Kim M., Sapp E., Mcintyre C., Castan G., Aronin N. Huntingtin Expression Stimulates Endosomal – Lysosomal Activity , Endosome Tubulation , and Autophagy // *J. Neurosci*. - 2000. - T. 20. - № 19. - C. 7268–7278.
99. Kennedy L., Evans E., Chen C. M., Craven L., Detloff P. J., Ennis M., Shelbourne P. F. Dramatic tissue-specific mutation length increases are an early molecular event in Huntington disease pathogenesis // *Hum. Mol. Genet*. - 2003. - T. 12. - № 24. - C. 3359–3365.
100. Kiernan J. A., Hudson A. J. Changes in shapes of surviving motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis // *Brain*. - 1993. - T. 116. - № 1. - C. 203–215.
101. Kim A., Lalonde K., Truesdell A., Welter P. G., Brocardo P. S., Rosenstock T. R., Gil-mohapel J. New avenues for the treatment of huntington's disease // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. T. 22. № 16. C. 8363.

102. Kim D., Kim J., Hur J. K., Been K. W., Yoon S.-H., Kim J.-S. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells // *Nat. Biotechnol.* - 2016. - T. 34. - № 8. - C. 863–868.
103. Kim S., Kim D. K., Jeong S., Lee J. The Common Cellular Events in the Neurodegenerative Diseases and the Associated Role of Endoplasmic Reticulum Stress // *Int. J. Mol. Sci.* - 2022. - T. 23. - № 11.
104. Kim Y. G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1996. - T. 93. - № 3. - C. 1156–1160.
105. Kimura S., Noda T., Yoshimori T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes // *Cell Struct. Funct.* - 2008. - T. 33. - № 1. - C. 109–122.
106. King J. C., Williams T. H., Gerall A. A. Transformations of hypothalamic arcuate neurons - I. Changes associated with stages of the estrous cycle // *Cell Tissue Res.* - 1974. - T. 153. - № 4. - C. 497–515.
107. Kipanyula M. J., Contreras L., Zampese E., Lazzari C., Wong A. K. C., Pizzo P., Fasolato C., Pozzan T. Ca²⁺ dysregulation in neurons from transgenic mice expressing mutant presenilin 2 // *Aging Cell.* - 2012. - T. 11. - № 5. - C. 885–893.
108. Kleinstiver B. P., Pattanayak V., Prew M. S., Tsai S. Q., Nguyen N. T., Zheng Z., Joung J. K. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects // *Nature.* - 2016. - T. 529. - № 7587. - C. 490–495.
109. Klionsky D. J., Abdel-Aziz A. K., Abdelfatah S., Abdellatif M., Et A. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) // *Autophagy.* - 2021. - T. 17. - № 1. - C. 1–382.
110. Knöpfel T., Rietschin L., Gähwiler B. H. Organotypic Co-Cultures of Rat Locus Coeruleus and Hippocampus // *Eur. J. Neurosci.* - 1989. - T. 1. - № 6. - C. 678–689.
111. Koffie R. M., Meyer-Luehmann M., Hashimoto T., Adams K. W., Mielke M. L., Garcia-Alloza M., Micheva K. D., Smith S. J., Kim M. L., Lee V.

M., Hyman B. T., Spire-Jones T. L. Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2009. - T. 106. - № 10. - C. 4012–4017.

112. Komatsu M., Waguri S., Chiba T., Murata S., Iwata J. I., Tanida I., Ueno T., Koike M., Uchiyama Y., Kominami E., Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice // *Nature*. - 2006. - T. 441. - № 7095. - C. 880–884.

113. Komatsu M., Qing J. W., Holstein G. R., Friedrich V. L., Iwata J. I., Kominami E., Chait B. T., Tanaka K., Yue Z. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2007. - T. 104. - № 36. - C. 14489–14494.

114. Koning A. J., Roberts C. J., Wright R. L. Different subcellular localization of *Saccharomyces cerevisiae* HMG-CoA reductase isozymes at elevated levels corresponds to distinct endoplasmic reticulum membrane proliferations // *Mol. Biol. Cell*. - 1996. - T. 7. - № 5. - C. 769–789.

115. Kramer M. L., Schulz-Schaeffer W. J. Presynaptic α -synuclein aggregates, not Lewy bodies, cause neurodegeneration in dementia with lewy bodies // *J. Neurosci.* - 2007. - T. 27. - № 6. - C. 1405–1410.

116. Kraskovskaya N. A., Bezprozvanny I. B. Normalization of Calcium Balance in Striatal Neurons in Huntington's Disease: Sigma 1 Receptor as a Potential Target for Therapy // *Biochem.* - 2021. - T. 86. - № 4. - C. 471–479.

117. Kuijpers M., Dis V. van, Haasdijk E. D., Harterink M., Vocking K., Post J. A., Scheper W., Hoogenraad C. C., Jaarsma D. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-associated VAPB-P56S inclusions represent an ER quality control compartment // *Acta Neuropathol. Commun.* - 2014. - T. 2. - № 1. - C. 1–19.

118. Kwa L., Larson D., Yeh C., Bega D. Influence of age of onset on Huntington's disease phenotype // *Tremor and Other Hyperkinetic Movements*. - 2020. - T. 10.

119. Lagace T. A., Ridgway N. D. The role of phospholipids in the

biological activity and structure of the endoplasmic reticulum // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* - 2013. - T. 1833. - № 11. - C. 2499–2510.

120. Landles C., Milton R. E., Ali N., Flomen R., Flower M., Schindler F., Gomez-Paredes C., Bondulich M. K., Osborne G. F., Goodwin D., Salsbury G., Benn C. L., Sathasivam K., Smith E. J., Tabrizi S. J., Wanker E. E., Bates G. P. Subcellular Localization And Formation Of Huntingtin Aggregates Correlates With Symptom Onset And Progression In A Huntington'S Disease Model // *Brain Commun.* - 2020. - T. 2. - № 2. - C. fcaa066.

121. Langbehn D. R. Longer CAG repeat length is associated with shorter survival after disease onset in Huntington disease // *Am. J. Hum. Genet.* - 2022. - T. 109. - № 1. - C. 172–179.

122. Langou K., Moumen A., Pellegrino C., Aebischer J., Medina I., Aebischer P., Raoul C. AAV-mediated expression of wild-type and ALS-linked mutant VAPB selectively triggers death of motoneurons through a Ca²⁺-dependent ER-associated pathway // *J. Neurochem.* - 2010. - T. 114. - № 3. - C. 795–829.

123. Larsen K. E., Schmitz Y., Troyer M. D., Mosharov E., Dietrich P., Quazi A. Z., Savalle M., Nemani V., Chaudhry F. A., Edwards R. H., Stefanis L., Sulzer D. α -Synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis // *J. Neurosci.* - 2006. - T. 26. - № 46. - C. 11915–11922.

124. Lashuel H. A., Lansbury P. T. Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? // *Q. Rev. Biophys.* - 2006. - T. 39. - № 2. - C. 167–201.

125. LaSpada A. R. Trinucleotide repeat instability: Genetic features and molecular mechanisms // *Brain Pathol.* - 1997. - T. 7. - № 3. - C. 943–963.

126. LaVail J. H., Wolf M. K. Postnatal development of the mouse dentate gyrus in organotypic cultures of the hippocampal formation // *Am. J. Anat.* - 1973. - T. 137. - № 1. - C. 47–65.

127. Lee J. H., Yu W. H., Kumar A., Lee S., Mohan P. S., Peterhoff C. M.,

Wolfe D. M., Martinez-Vicente M., Massey A. C., Sovak G., Uchiyama Y., Westaway D., Cuervo A. M., Nixon R. A. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations // *Cell*. - 2010. - T. 141. - № 7. - C. 1146–1158.

128. Lee J. M. et al. CAG Repeat Not Polyglutamine Length Determines Timing of Huntington's Disease Onset // *Cell*. - 2019. - T. 178. - № 4. - C. 887–900.

129. Lendvai B., Stern E. A., Chen B., Svoboda K. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo // *Nature*. - 2000. - T. 404. - № 6780. - C. 876–881.

130. Leone T. C. et al. PGC-1 α deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: Muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis // *PLoS Biol*. - 2005. - T. 3. - № 4. - C. e101.

131. Li H., Li S.-H., Cheng A. L., Mangiarini L., Bates G. P., Li X.-J. Ultrastructural localization and progressive formation of neuropil aggregates in Huntington's disease transgenic mice // *Hum. Mol. Genet*. - 1999. - T. 8. - № 7. - C. 1227–1236.

132. Li H., Li S.-H., Yu Z.-X., Shelbourne P., Li X.-J. Huntingtin Aggregate-Associated Axonal Degeneration is an Early Pathological Event in Huntington's Disease Mice // *J. Neurosci*. - 2001. - T. 21. - № 21. - C. 8473–8481.

133. Li X. J., Li S. H., Sharp A. H., Nucifora F. C., Schilling G., Lanahan A., Worley P., Snyder S. H., Ross C. A. A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology // *Nature*. - 1995. - T. 378. - № 6555. - C. 398–402.

134. Li X. J., Li S. H. HAP1 and intracellular trafficking // *Trends Pharmacol. Sci*. - 2005. - T. 26. - № 1. - C. 1–3.

135. Li X. J., Orr A. L., Li S. Impaired mitochondrial trafficking in Huntington's disease // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis*. 2010. T. 1802. № 1. C. 62–65.

136. Lim D., Fedrizzi L., Tartari M., Zuccato C., Cattaneo E., Brini M.,

Carafoli E. Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease // *J. Biol. Chem.* - 2008. - T. 283. - № 9. - C. 5780–5789.

137. Lim D., Dematteis G., Tapella L., Genazzani A. A., Cali T., Brini M., Verkhratsky A. Ca²⁺ handling at the mitochondria-ER contact sites in neurodegeneration // *Cell Calcium*. 2021. T. 98. C. 102453.

138. Lin J. et al. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1 α null mice // *Cell*. - 2004. - T. 119. - № 1. - C. 121–135.

139. Lin M. T., Beal M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases // *Nature*. - 2006. - T. 443. - № 7113. - C. 787–795.

140. Lippincott-Schwartz J., Roberts T. H., Hirschberg K. Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* - 2000. - T. 16. - C. 557–589.

141. Liu J., Huang Y., Li T., Jiang Z., Zeng L., Hu Z. The role of the Golgi apparatus in disease (Review) // *Int. J. Mol. Med.* 2021. T. 47. № 4. C. 1–14.

142. Ma S., Zuo Y. Synaptic modifications in learning and memory – A dendritic spine story // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2022. T. 125. C. 84–90.

143. MacDonald M. E. et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes // *Cell*. - 1993. - T. 72. - № 6. - C. 971–983.

144. Maday S., Wallace K. E., Holzbaur E. L. F. Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons // *J. Cell Biol.* - 2012. - T. 196. - № 4. - C. 407–417.

145. Mahapatra K. K., Mishra S. R., Behera B. P., Patil S., Gewirtz D. A., Bhutia S. K. The lysosome as an imperative regulator of autophagy and cell death // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2021. - T. 78. - № 23. - C. 1–15.

146. Malankhanova T., Sulдина L., Grigor E., Medvedev S., Minina J., Morozova K., Kiseleva E., Zakian S., Malakhova A. A Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Isogenic Model of Huntington's Disease Based on Neuronal Cells Has Several Relevant Phenotypic Abnormalities // *J. Pers. Med.* - 2020a. - T. 10. - № 250. - C. 215.

147. Malankhanova T., Sorokin M., Medvedev S., Zakian S., Malakhova A. Introducing an Expanded Trinucleotide Repeat Tract into the Human Genome for Huntington's Disease Modeling In Vitro // *Curr. Protoc. Hum. Genet.* - 2020b. - T. 106. - № 1. - C. 100.
148. Malkeyeva D., Kiseleva E., Fedorova S. A. Loss of Hsp67Bc leads to autolysosome enlargement in the *Drosophila* brain // *Cell Biol. Int.* - 2022. - T. 46. - № 2. - C. 203–212.
149. Mao Y., Chen X., Xu M., Fujita K., Motoki K., Sasabe T., Homma H., Murata M., Tagawa K., Tamura T., Kaye J., Finkbeiner S., Blandino G., Sudol M., Okazawa H. Targeting TEAD/YAP-transcription-dependent necrosis, TRIAD, ameliorates Huntington's disease pathology // *Hum. Mol. Genet.* - 2016. - T. 25. - № 21. - C. 4749–4770.
150. Maria Fimia G., Stoykova A., Romagnoli A., Giunta L., Bartolomeo S. Di, Nardacci R., Corazzari M., Fuoco C., Ucar A., Schwartz P., Gruss P., Piacentini M., Chowdhury K., Cecconi F. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system // *Nature.* - 2007. - T. 447. - № 7148. - C. 1121–1125.
151. Martinez-Vicente M., Tallochy Z., Wong E., Tang G., Koga H., Kaushik S., Vries R. De, Arias E., Harris S., Sulzer D., Cuervo A. M. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease // *Nat. Neurosci.* - 2010. - T. 13. - № 5. - C. 567–576.
152. Mattis V. B., Svendsen C. N. Modeling Huntington's disease with patient-derived neurons // *Brain Res.* - 2017. - T. 1656. - C. 76–87.
153. Medina A., Mahjoub Y., Shaver L., Pringsheim T. Prevalence and Incidence of Huntington's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis // *Mov. Disord.* - 2022. - T. 37. - № 12. - C. 2327–2335.
154. Meer G. Van, Voelker D. R., Feigenson G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2008. - T. 9. - № 2. - C. 112–124.
155. Mehraein P., Yamada M., Tarnowska-Dziduszko E. Quantitative study

on dendrites and dendritic spines in Alzheimer's disease and senile dementia // Adv. Neurol. - 1975. - T. 12. - C. 453–468.

156. Migazzi A. et al. Huntingtin-mediated axonal transport requires arginine methylation by PRMT6 // Cell Rep. - 2021. - T. 35. - № 2.

157. Monckton D. G. The Contribution of Somatic Expansion of the CAG Repeat to Symptomatic Development in Huntington's Disease: A Historical Perspective // J. Huntingtons. Dis. 2021. T. 10. № 1. C. 7–33.

158. Monk R., Connor B. Cell reprogramming to model huntington's disease: A comprehensive review // Cells. 2021. T. 10. № 7. C. 1565.

159. Morciano G., Naumova N., Koprowski P., Valente S., Sardão V. A., Potes Y., Rimessi A., Wieckowski M. R., Oliveira P. J. The mitochondrial permeability transition pore: an evolving concept critical for cell life and death // Biol. Rev. - 2021. - T. 96. - № 6. - C. 2489–2551.

160. Mórotz G. M., Vos K. J. De, Vagnoni A., Ackerley S., Shaw C. E., Miller C. C. J. Amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant VAPBP56s perturbs calcium homeostasis to disrupt axonal transport of mitochondria // Hum. Mol. Genet. - 2012. - T. 21. - № 9. - C. 1979–1988.

161. Nakamori M. et al. A slipped-CAG DNA-binding small molecule induces trinucleotide-repeat contractions in vivo // Nat. Genet. - 2020. - T. 52. - № 2. - C. 146–159.

162. Nasir J., Floresco S. B., O'Kusky J. R., Diewert V. M., Richman J. M., Zeisler J., Borowski A., Marth J. D., Phillips A. G., Hayden M. R. Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes // Cell. - 1995. - T. 81. - № 5. - C. 811–823.

163. Nekrasov E. D. et al. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons // Mol. Neurodegener. - 2016. - T. 11. - № 1. - C. 1–15.

164. Nemani V. M., Lu W., Berge V., Nakamura K., Onoa B., Lee M. K., Chaudhry F. A., Nicoll R. A., Edwards R. H. Increased Expression of α -Synuclein

Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering after Endocytosis // *Neuron*. - 2010. - T. 65. - № 1. - C. 66–79.

165. Nickerson P. A., Curtis J. C. Concentric whorls of rough endoplasmic reticulum in adrenocortical cells of the mongolian gerbil // *J. Cell Biol.* - 1969. - T. 40. - № 3. - C. 859.

166. Nixon R. A., Wegiel J., Kumar A., Yu W. H., Peterhoff C., Cataldo A., Cuervo A. M. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: An immuno-electron microscopy study // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* - 2005. - T. 64. - № 2. - C. 113–122.

167. Okada N., Yako T., Nakamura S., Shimazawa M., Hara H. Reduced mitochondrial complex II activity enhances cell death via intracellular reactive oxygen species in STHdhQ111 striatal neurons with mutant huntingtin // *J. Pharmacol. Sci.* - 2021. - T. 147. - № 4. - C. 367–375.

168. Ono K., Kim S. O., Han J. Susceptibility of Lysosomes to Rupture Is a Determinant for Plasma Membrane Disruption in Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Cell Death // *Mol. Cell. Biol.* - 2003. - T. 23. - № 2. - C. 665–676.

169. Østergaard K., Finsen B., Zimmer J. Organotypic slice cultures of the rat striatum: an immunocytochemical, histochemical and in situ hybridization study of somatostatin, neuropeptide Y, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase, and enkephalin // *Exp. Brain Res.* - 1995. - T. 103. - № 1. - C. 70–84.

170. Ottolini D., Calí T., Szabò I., Brini M. Alpha-synuclein at the intracellular and the extracellular side: Functional and dysfunctional implications // *Biol. Chem.* - 2017. - T. 398. - № 1. - C. 77–100.

171. Ozoemena E., Chimeremna V. O., Chinekwu S. O., Florence O. N. Huntington Disease: Mechanism of Pathogenesis and Recent Developments in Its Therapeutic Strategies- A Short Review // *J. Chem. Rev.* - 2023. - T. 5. - № 2. - C. 129–142.

172. Palay S. L., Chan-Palay V. General morphology of neurons and neuroglia // *Compr. Physiol.* - 2011. - C. 5–37.

173. Parone P. A., Cruz S. Da, Han J. S., McAlonis-Downes M., Vetto A. P., Lee S. K., Tseng E., Cleveland D. W. Enhancing mitochondrial calcium buffering capacity reduces aggregation of misfolded SOD1 and motor neuron cell death without extending survival in mouse models of inherited amyotrophic lateral sclerosis // *J. Neurosci.* - 2013. - T. 33. - № 11. - C. 4657–4671.

174. Paulson H. Repeat expansion diseases // *Handb. Clin. Neurol.* - 2018. - T. 147. - C. 105–123.

175. Paulson H. L., Perez M. K., Trotter Y., Trojanowski J. Q., Subramony S. H., Das S. S., Vig P., Mandel J. L., Fischbeck K. H., Pittman R. N. Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3 // *Neuron.* - 1997. - T. 19. - № 2. - C. 333–344.

176. Pchitskaya E., Rakovskaya A., Chigray M., Bezprozvanny I. Cytoskeleton Protein EB3 Contributes to Dendritic Spines Enlargement and Enhances Their Resilience to Toxic Effects of Beta-Amyloid // *Int. J. Mol. Sci.* - 2022. - T. 23. - № 4. - C. 2274.

177. Pchitskaya E., Bezprozvanny I. Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective // *Front. Synaptic Neurosci.* - 2020. - T. 12. - C. 31.

178. Pedrazzini E., Villa A., Longhi R., Bulbarelli A., Borgese N. Mechanism of residence of cytochrome b(5), a tail-anchored protein, in the endoplasmic reticulum // *J. Cell Biol.* - 2000. - T. 148. - № 5. - C. 889–914.

179. Pereira V. G., Gazarini M. L., Rodrigues L. C., Silva F. H. Da, Han S. W., Martins A. M., Tersariol I. L. S., D'Almeida V. Evidence of lysosomal membrane permeabilization in mucopolysaccharidosis type I: Rupture of calcium and proton homeostasis // *J. Cell. Physiol.* - 2010. - T. 223. - № 2. - C. 335–342.

180. Pérez-Navarro E., Alberch J., Neveu I., Arenas E. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 differentially regulate the phenotype and prevent degenerative changes in striatal projection neurons after excitotoxicity in vivo // *Neuroscience.* - 1999. - T. 91. - № 4. - C. 1257–1264.

181. Perner C., Krüger E. Endoplasmic Reticulum Stress and Its Role in

Homeostasis and Immunity of Central and Peripheral Neurons // *Front. Immunol.* 2022. T. 13. C. 859703.

182. Peterson T. R., Sengupta S. S., Harris T. E., Carmack A. E., Kang S. A., Balderas E., Guertin D. A., Madden K. L., Carpenter A. E., Finck B. N., Sabatini D. M. MTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the srebp pathway // *Cell.* - 2011. - T. 146. - № 3. - C. 408–420.

183. Pickford F., Masliah E., Britschgi M., Lucin K., Narasimhan R., Jaeger P. A., Small S., Spencer B., Rockenstein E., Levine B., Wyss-Coray T. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice // *J. Clin. Invest.* - 2008. - T. 118. - № 6. - C. 2190–2199.

184. Platt F. M., Boland B., Spoel A. C. van der. Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction // *J. Cell Biol.* - 2012. - T. 199. - № 5. - C. 723–734.

185. Poole A. C., Thomas R. E., Andrews L. A., McBride H. M., Whitworth A. J., Pallanck L. J. The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2008. - T. 105. - № 5. - C. 1638–1643.

186. Poppi L. A., Ho-Nguyen K. T., Shi A., Daut C. T., Tischfield M. A. Recurrent implication of striatal cholinergic interneurons in a range of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neuropsychiatric disorders // *Cells.* 2021. T. 10. № 4. C. 907.

187. Preston A. M., Gurisik E., Bartley C., Laybutt D. R., Biden T. J. Reduced endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi protein trafficking contributes to ER stress in lipotoxic mouse beta cells by promoting protein overload // *Diabetologia.* - 2009. - T. 52. - № 11. - C. 2369–2373.

188. Puls I., Jonnakuty C., LaMonte B. H., Holzbaur E. L. F., Tokito M., Mann E., Floeter M. K., Bidus K., Drayna D., Oh S. J., Brown R. H., Ludlow C. L., Fischbeck K. H. Mutant dynactin in motor neuron disease // *Nat. Genet.* - 2003. - T. 33. - № 4. - C. 455–456.

189. Pupyshev A. B., Tikhonova M. A., Akopyan A. A., Tenditnik M. V., Dubrovina N. I., Korolenko T. A. Therapeutic activation of autophagy by combined treatment with rapamycin and trehalose in a mouse MPTP-induced model of Parkinson's disease // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 2019. - T. 177. - C. 1–11.
190. Qin Y., Li S., Li X. J., Yang S. CRISPR-Based Genome-Editing Tools for Huntington's Disease Research and Therapy // *Neurosci. Bull.* 2022. T. 38. № 11. C. 1397–1408.
191. Quarrell O. W. J., Nance M. A., Nopoulos P., Reilmann R., Oosterloo M., Tabrizi S. J., Furby H., Saft C., Roos R. A. C., Squitieri F., Landwehrmeyer G. B., Burgunder J. M. Defining pediatric huntington disease: Time to abandon the term Juvenile Huntington Disease? // *Mov. Disord.* - 2019. - T. 34. - № 4. - C. 584–585.
192. Rao R. V., Ellerby H. M., Bredesen D. E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program // *Cell Death Differ.* - 2004. - T. 11. - № 4. - C. 372–380.
193. Ravalia A. S., Lau J., Barron J. C., Purchase S. L. M., Southwell A. L., Hayden M. R., Nafar F., Parsons M. P. Super-resolution imaging reveals extrastriatal synaptic dysfunction in presymptomatic Huntington disease mice // *Neurobiol. Dis.* - 2021. - T. 152. - № February. - C. 105293.
194. Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., Davies J. E., Luo S., Oroz L. G., Scaravilli F., Easton D. F., Duden R., O'Kane C. J., Rubinsztein D. C. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease // *Nat. Genet.* - 2004. - T. 36. - № 6. - C. 585–595.
195. Ravikumar B., Acevedo-Arozena A., Imarisio S., Berger Z., Vacher C., O'Kane C. J., Brown S. D. M., Rubinsztein D. C. Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins // *Nat. Genet.* - 2005. - T. 37. - № 7. - C. 771–776.
196. Rikani A. A., Choudhry Z., Choudhry A. M., Rizvi N., Ikram H.,

Mobassarah N. J., Tulli S. The mechanism of degeeration of striatal neuronal subtypes in Huntington disease // *Ann. Neurosci.* - 2014. - T. 21. - № 3. - C. 112.

197. Robertson R. T., Baratta J., Kageyama G. H., Ha D. H., Yu J. Specificity of attachment and neurite outgrowth of dissociated basal forebrain cholinergic neurons seeded on to organotypic slice cultures of forebrain // *Neuroscience.* - 1997. - T. 80. - № 3. - C. 741–752.

198. Rook M. E., Southwell A. L. Antisense Oligonucleotide Therapy : From Design to the Huntington Disease Clinic // *BioDrugs.* - 2022. - T. 36. - № 2. - C. 105–119.

199. Roos R. A. C., Bots G. T. A. M. Nuclear membrane indentations in Huntington's chorea // *J. Neurol. Sci.* - 1983. - T. 61. - № 1.

200. Ross C. A. Intranuclear neuronal inclusions: A common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? // *Neuron.* - 1997. - T. 19. - № 6. - C. 1147–1150.

201. Rui Y., Xu Z., Patel B., Chen Z., Chen D., Tito A., David G., Sun Y., Stimming E. F., Bellen H. J., Cuervo A. M., Zhang S. Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy // *Nat. Cell Biol.* - 2015. - T. 17. - № 3. - C. 262–275.

202. Santos-Rosa H., Leung J., Grimsey N., Peak-Chew S., Siniosoglou S. The yeast lipin Smp2 couples phospholipid biosynthesis to nuclear membrane growth // *EMBO J.* - 2005. - T. 24. - № 11. - C. 1931–1941.

203. Sap K. A., Guler A. T., Bury A., Dekkers D., Demmers J. A. A., Reits E. A. Identification of Full-Length Wild-Type and Mutant Huntingtin Interacting Proteins by Crosslinking Immunoprecipitation in Mice Brain Cortex // *J. Huntingtons. Dis.* - 2021. - T. 10. - № 3. - C. 335–347.

204. Saudou F., Finkbeiner S., Devys D., Greenberg M. E. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions // *Cell.* - 1998. - T. 95. - № 1. - C. 55–66.

205. Saudou F., Humbert S. The biology of huntingtin // *Neuron.* - 2016. - T. 89. - № 5. - C. 910–926.

206. Schrank S., Barrington N., Stutzmann G. E. Calcium-handling defects and neurodegenerative disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2020. - T. 12. - № 7. - C. 1–25.
207. Schultz J. L., Moser A. D., Nopoulos P. C. The association between cag repeat length and age of onset of juvenile-onset huntington's disease // *Brain Sci.* - 2020. - T. 10. - № 9. - C. 575.
208. Scott D. A., Tabarean I., Tang Y., Cartier A., Masliah E., Roy S. A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in α -synuclein-induced neurodegeneration // *J. Neurosci.* - 2010. - T. 30. - № 24. - C. 8083–8095.
209. Shang H., Zhao X., Zhang X. Neurodegenerative Diseases // *Pediatric Neuroimaging* / под ред. H. Liu, X. Zhang. : People's Medical Publishing House, 2022. C. 211–214.
210. Shen H. M., Mizushima N. At the end of the autophagic road: An emerging understanding of lysosomal functions in autophagy // *Trends Biochem. Sci.* - 2014. - T. 39. - № 2. - C. 61–71.
211. Shi M., Chai Y., Zhang J., Chen X. Endoplasmic reticulum stress-associated neuronal death and innate immune response in neurological diseases // *Front. Immunol.* - 2022. - T. 12. - C. 1–26.
212. Shibata M., Lu T., Furuya T., Degtrev A., Mizushima N., Yoshimori T., MacDonald M., Yankner B., Yuan J. Regulation of intracellular accumulation of mutant huntingtin by beclin 1 // *J. Biol. Chem.* - 2006. - T. 281. - № 20. - C. 14474–14485.
213. Shirasaki D. I., Greiner E. R., Al-Ramahi I., Gray M., Boontheung P., Geschwind D. H., Botas J., Coppola G., Horvath S., Loo J. A., Yang X. W. Network organization of the huntingtin proteomic interactome in mammalian brain // *Neuron.* - 2012. - T. 75. - № 1. - C. 41–57.
214. Sidibe D. K., Vogel M. C., Maday S. Organization of the autophagy pathway in neurons // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2022. T. 75. C. 102554.
215. Siniosoglou S., Santos-Rosa H., Rappsilber J., Mann M., Hurt E. A novel complex of membrane proteins required for formation of a spherical nucleus

// EMBO J. - 1998. - T. 17. - № 22. - C. 6449–6464.

216. Siniosoglou S. Phospholipid metabolism and nuclear function: Roles of the lipin family of phosphatidic acid phosphatases // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* - 2013. - T. 1831. - № 3. - C. 575–581.

217. Skinner P. J., Koshy B. T., Cummings C. J., Klement I. A., Helin K., Servadio A., Zoghbi H. Y., Orr H. T. Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures // *Nature.* - 1997. - T. 389. - № 6654. - C. 971–974.

218. Slanzi A., Iannoto G., Rossi B., Zenaro E., Constantin G. In vitro models of neurodegenerative diseases // *Front. Cell Dev. Biol.* - 2020. - T. 8. - C. 328.

219. Slow E. J., Graham R. K., Osmand A. P., Devon R. S., Lu G., Deng Y., Pearson J., Vaid K., Bissada N., Wetzel R., Leavitt B. R., Hayden M. R. Absence of behavioral abnormalities and neurodegeneration in vivo despite widespread neuronal huntingtin inclusions // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2005. - T. 102. - № 32. - C. 11402–11407.

220. Snapp E. L., Hegde R. S., Francolini M., Lombardo F., Colombo S., Pedrazzini E., Borgese N., Lippincott-Schwartz J. Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions // *J. Cell Biol.* - 2003. - T. 163. - № 2. - C. 257–269.

221. Soper J. H., Roy S., Stieber A., Lee E., Wilson R. B., Trojanowski J. Q., Burd C. G., Lee V. M. Y. α -synuclein-induced aggregation of cytoplasmic vesicles in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Biol. Cell.* - 2008. - T. 19. - № 3.

222. Sprenger G. P., Zwaan K. F. Van Der, Roos R. A. C., Achterberg W. P. The prevalence and the burden of pain in patients with Huntington disease: A systematic review and meta-analysis // *Pain.* - 2019. - T. 160. - № 4. - C. 773–783.

223. Squitieri F., Falleni A., Cannella M., Orobello S., Fulceri F., Lenzi P., Fornai F. Abnormal morphology of peripheral cell tissues from patients with Huntington disease // *J. Neural Transm.* - 2010. - T. 117. - № 1. - C. 77–83.

224. Sree S., Parkkinen I., Their A., Airavaara M., Jokitalo E.

Morphological heterogeneity of the endoplasmic reticulum within neurons and its implications in neurodegeneration // *Cells*. - 2021. - T. 10. - № 5. - C. 970.

225. Stack E. C., Matson W. R., Ferrante R. J. Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: Translational strategies using antioxidants // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2008. - T. 1147. - № 1. - C. 79–92.

226. Stefanis L., Larsen K. E., Rideout H. J., Sulzer D., Greene L. A. Expression of A53T mutant but not wild-type α -synuclein in PC12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death // *J. Neurosci.* - 2001. - T. 21. - № 24. - C. 9549–9560.

227. Stoica R., Vos K. J. De, Paillusson S., Mueller S., Sancho R. M., Lau K. F., Vizcay-Barrena G., Lin W. L., Xu Y. F., Lewis J., Dickson D. W., Petrucelli L., Mitchell J. C., Shaw C. E., Miller C. C. J. ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43 // *Nat. Commun.* - 2014. - T. 5. - № 1. - C. 3996.

228. Strubbe-Rivera J. O., Schrad J. R., Pavlov E. V., Conway J. F., Parent K. N., Bazil J. N. The mitochondrial permeability transition phenomenon elucidated by cryo-EM reveals the genuine impact of calcium overload on mitochondrial structure and function // *Sci. Rep.* - 2021. - T. 11. - № 1. - C. 1037.

229. Suldina L. A., Sorokina A. E., Morozova K. N. Ultrastructural heterogeneity of the mitochondrial population in rat embryonic and induced pluripotent stem cells // *Cell Biol. Int.* - 2021. - T. 45. - № 11. - C. 2238–2250.

230. Supinski G. S., Schroder E. A., Callahan L. A. Mitochondria and Critical Illness // *Chest*. 2020. T. 157. № 2. C. 310–322.

231. Swami M., Hendricks A. E., Gillis T., Massood T., Mysore J., Myers R. H., Wheeler V. C. Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset // *Hum. Mol. Genet.* - 2009. - T. 18. - № 16. - C. 3039–3047.

232. Swerdlow R. H., Burns J. M., Khan S. M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis // *J. Alzheimer's Dis.* - 2010. - T. 20. - №

SUPPL.2. - C. S265–S279.

233. Swerdlow R. H., Kish S. J. Mitochondria in Alzheimer's disease // *Int. Rev. Neurobiol.* - 2002. - T. 53. - C. 341–385.

234. Tabrizi S. J., Flower M. D., Ross C. A., Wild E. J. Huntington disease: new insights into molecular pathogenesis and therapeutic opportunities // *Nat. Rev. Neurol.* - 2020. - T. 16. - № 10. - C. 529–546.

235. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell.* - 2007. - T. 131. - № 5. - C. 861–872.

236. Takei K., Mignery G. A., Mugnaini E., Südhof T. C., Camilli P. De. Inositol 1,4,5-Trisphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblasts and in cerebellar purkinje cells // *Neuron.* - 1994. - T. 12. - № 2. - C. 327–342.

237. Tange Y., Hirata A., Niwa O. An evolutionarily conserved fission yeast protein, Ned1, implicated in normal nuclear morphology and chromosome stability, interacts with Dis3, Pim1/RCC1 and an essential nucleoporin // *J. Cell Sci.* - 2002. - T. 115. - № 22. - C. 4375–4385.

238. Taran A. S., Shuvalova L. D., Lagarkova M. A., Alieva I. B. Huntington's Disease-An Outlook on the Interplay of the HTT Protein, Microtubules and Actin Cytoskeletal Components // *Cells.* - 2020. - T. 9. - № 6. - C. 1514.

239. Tellez-Nagel I., Johnson A. B., Terry R. D. Studies on brain biopsies of patients with huntington's chorea // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* - 1974. - T. 33. - № 2. - C. 308–332.

240. Thomson J. A. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science (80-.).* - 1998. - T. 282. - № 5391. - C. 1145–1147.

241. Ullio C., Casas J., Brunk U. T., Sala G., Fabriàs G., Ghidoni R., Bonelli G., Baccino F. M., Autelli R. Sphingosine mediates TNF α -induced lysosomal membrane permeabilization and ensuing programmed cell death in hepatoma cells // *J. Lipid Res.* - 2012. - T. 53. - № 6. - C. 1134–1143.

242. Upadhayay S., Jamwal S., Kumar P. Animal models of Huntington's disease and their applicability to novel drug discovery and development // *Expert Opin. Drug Discov.* - 2023. - T. 18. - № 5. - C. 527–538.
243. Vallese F., Barazzuol L., Maso L., Brini M., Cali T. ER-Mitochondria Calcium Transfer, Organelle Contacts and Neurodegenerative Diseases // *Adv. Exp. Med. Biol.* - 2020. - T. 1131. - C. 719–746.
244. VanDerBurg J. M. M., Gardiner S. L., Ludolph A. C., Landwehrmeyer G. B., Roos R. A. C., Aziz N. A. Body weight is a robust predictor of clinical progression in Huntington disease // *Ann. Neurol.* - 2017. - T. 82. - № 3. - C. 479–483.
245. Vidal R., Caballero B., Couve A., Hetz C. Converging Pathways in the Occurrence of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Huntingtons Disease // *Curr. Mol. Med.* - 2011. - T. 11. - № 1. - C. 1–12.
246. Vitet H., Brandt V., Saudou F. Traffic signaling: new functions of huntingtin and axonal transport in neurological disease // *Curr. Opin. Neurobiol.* - 2020. - T. 63. - C. 122–130.
247. Walsh K., Megyesi J., Hammond R. Human central nervous system tissue culture: A historical review and examination of recent advances // *Neurobiol. Dis.* - 2005. - T. 18. - № 1. - C. 2–18.
248. Wang F., Boya R. G. P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death // *Traffic.* - 2018. - T. 19. - C. 918–931.
249. Wang Q. J., Ding Y., Kohtz S., Mizushima N., Cristea I. M., Rout M. P., Chait B. T., Zhong Y., Heintz N., Yue Z. Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration // *J. Neurosci.* - 2006. - T. 26. - № 31. - C. 8057–8068.
250. Wang X., Su B., Fujioka H., Zhu X. Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients // *Am. J. Pathol.* - 2008a. - T. 173. - № 2. - C. 470–482.
251. Wang X., Su B., Siedlak S. L., Moreira P. I., Fujioka H., Wang Y., Casadesus G., Zhu X. Amyloid- β overproduction causes abnormal mitochondrial

dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 2008b. - T. 105. - № 49. - C. 19318–19323.

252. Whetsell W. O., Schwarcz R. The organotypic tissue culture model of corticostriatal system used for examining amino acid neurotoxicity and its antagonism: studies on kainic acid, quinolinic acid and (-) 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. // J. Neural Transm. Suppl. - 1983. - T. 19. - C. 53–63.

253. Wong E., Cuervo A. M. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases // Nat. Neurosci. - 2010. - T. 13. - № 7. - C. 805–811.

254. Wong Y. C., Holzbaur E. L. F. The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation // J. Neurosci. - 2014. - T. 34. - № 4. - C. 1293–1305.

255. Wright G. E. B. et al. Length of Uninterrupted CAG, Independent of Polyglutamine Size, Results in Increased Somatic Instability, Hastening Onset of Huntington Disease // Am. J. Hum. Genet. - 2019. - T. 104. - № 6. - C. 1116–1126.

256. Wu H. Y., Hudry E., Hashimoto T., Kuchibhotla K., Rozkalne A., Fan Z., Spires-Jones T., Xie H., Arbel-Ornath M., Grosskreutz C. L., Bacskai B. J., Hyman B. T. Amyloid β induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation // J. Neurosci. - 2010. - T. 30. - № 7. - C. 2636–2649.

257. Wu J., Shih H. P., Vigont V., Hrdlicka L., Diggins L., Singh C., Mahoney M., Chesworth R., Shapiro G., Zimina O., Wu Q., Glushankova L., Ahlijanian M., Koenig G., Mozhayeva G. N., Kaznacheyeva E., Bezprozvanny I. Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment // Chem. Biol. - 2011. - T. 18. - № 6. - C. 125–141.

258. Wu J., Ryskamp D. A., Liang X., Egorova P., Zakharova O., Hung G., Bezprozvanny I. Enhanced store-operated calcium entry leads to striatal synaptic loss in a huntington's disease mouse model // J. Neurosci. - 2016. - T. 36. - № 1. - C. 125–141.

259. Wu J. The Roles of Cytoskeleton in Huntington's Disease // 1st

International Conference on Health Big Data and Intelligent Healthcare (ICHIH 2022). , 2022. C. 572–576.

260. Xiao L., Drazinic C. Electron microscopy reveals differences in the cell structure of Huntington's disease mutation positive human embryonic stem cells during differentiation // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. - 2014. - T. 85. - № 1. - C. A23.

261. Xu L., Wang X., Tong C. Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Contact Sites and Neurodegeneration // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. T. 8. C. 428.

262. Xu S., Cao S., Zou B., Yue Y., Gu C., Chen X., Wang P., Dong X., Xiang Z., Li K., Zhu M., Zhao Q., Zhou G. An alternative novel tool for DNA editing without target sequence limitation: the structure-guided nuclease // *Genome Biol.* - 2016. - T. 17. - № 1. - C. 1–12.

263. Xu S., Zhang X., Liu C., Liu Q., Chai H., Luo Y., Li S. Role of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases: From an Epigenetic Perspective // *Front. Cell Dev. Biol.* - 2021. - T. 9. - C. 688789.

264. Yamamoto A., Masaki R., Tashiro Y. Formation of crystalloid endoplasmic reticulum in COS cells upon overexpression of microsomal aldehyde dehydrogenase by cDNA transfection // *J. Cell Sci.* - 1996. - T. 109. - № 7. - C. 1727–1738.

265. Yamamoto M., Suzuki S. O., Himeno M. The effects of dynein inhibition on the autophagic pathway in glioma cells: Original Article // *Neuropathology*. - 2010. - T. 30. - № 1. - C. 1–6.

266. Yang G., Pan F., Gan W. B. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories // *Nature*. - 2009. - T. 462. - № 7275. - C. 920–924.

267. Yang Y., Ouyang Y., Yang L., Beal M. F., McQuibban A., Vogel H., Lu B. Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2008. - T. 105. - № 19. - C. 7070–7075.

268. Yuste R., Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines

associated with long-term synaptic plasticity // *Annu. Rev. Neurosci.* - 2001. - T. 24. - № 1. - C. 1071–1089.

269. Zampese E., Fasolato C., Kipanyula M. J., Bortolozzi M., Pozzan T., Pizzo P. Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria interactions and Ca²⁺ cross-talk // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2011. - T. 108. - № 7. - C. 2777–2782.

270. Zeitlin S., Liu J. P., Chapman D. L., Papaioannou V. E., Efstratiadis A. Increased apoptosis and early embryonic lethality in mice nullizygous for the Huntington's disease gene homologue // *Nat. Genet.* - 1995. - T. 11. - № 2. - C. 155–163.

271. Zhang H., Wu L., Pchitskaya E., Zakharova O., Saito T., Saido T., Bezprozvanny I. Neuronal store-operated calcium entry and mushroom spine loss in amyloid precursor protein knock-in mouse model of Alzheimer's disease // *J. Neurosci.* - 2015. - T. 35. - № 39. - C. 13275–13286.

272. Zhang N., Bailus B. J., Ring K. L., Ellerby L. M. IPSC-based drug screening for Huntingtons disease // *Brain Res.* - 2016. - T. 1638. - C. 42–56.

273. Zhang X. J., Chen S., Huang K. X., Le W. D. Why should autophagic flux be assessed? // *Acta Pharmacol. Sin.* - 2013. - T. 34. - № 5. - C. 595–599.

274. Zhou Y., Zhen Y., Wang G., Liu B. Deconvoluting the Complexity of Reactive Oxygen Species (ROS) in Neurodegenerative Diseases // *Front. Neuroanat.* - 2022. - T. 16.

275. Zhou Z., Mogensen M. M., Powell P. P., Curry S., Wileman T. Foot-and-Mouth Disease Virus 3C Protease Induces Fragmentation of the Golgi Compartment and Blocks Intra-Golgi Transport // *J. Virol.* - 2013. - T. 87. - № 21. - C. 11721–11729.

276. Zolov S. N., Lupashin V. V. Cog3p depletion blocks vesicle-mediated Golgi retrograde trafficking in HeLa cells // *J. Cell Biol.* - 2005. - T. 168. - № 5. - C. 747–759.

277. Zuccato C., Valenza M., Cattaneo E. Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease // *Physiol. Rev.* - 2010. - T.

90. - № 3. - С. 905–981.

278. Некрасов Е. Д., Лебедева О. С., Честков И. В., Сюсина М. А., Федотова Е. Ю., Лагарькова М. А., Киселев С. Л., Гривенников И. А., Иллариошкин С. Н. Получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2011. - Т. 6. - С. 82–88.