**1. Обзор литературы**

Кальпаины были впервые идентифицированы в 60-х годах ХХ века двумя независимыми научными группами, которые обнаружили в белковых экстрактах, приготовленных из мозга [1] (14114836) или скелетных мышц [2] (5660041) крысы, чувствительную к содержанию кальция в среде протеолитическую активность. В 70-х годах ХХ века фермент был очищен и получил название Сalcium-activated neutral protease (CANP) - кальций-зависимая нейтральная протеаза, поскольку оптимум его ферментативной активности наблюдался при нейтральных значениях рН. Термин «calpain» (calcium-dependent papain like enzyme) был впервые предложен и применен Murachi в 1980 г. [3] (6278869). Вскоре было показано, что у млекопитающих протеазы семейства кальпаинов представлены двумя гомологами (степень гомологии выше 90%), характеризующимися различной потребностью к содержанию кальция в среде, необходимой для их активации [4] (6290467). На этом основании к данным гомологам были применены термины µ-кальпаин и m-кальпаин, для указания на микромолярную и миллимолярную концентрацию кальция, необходимую для их активации *in vitro* (в другой классификации это кальпаин-1 и кальпаин-2).

На сегодня уже охарактеризовано 15 членов семейства кальпаинов (кальпаин-1 – кальпаин-15). Показано, что основные представители данного семейства – µ- и m-кальпаин – являются гетеродимерами, состоящими из большой (массой примерно 80 кДа) каталитической субъединицы и общей для обоих кальпаинов малой регуляторной (массой 28 кДа) субъединицы; описана доменная организация соответствующих белков, показано наличие в их структуре нескольких EF-hand доменов, раскрыта структура активного центра; идентифицированы гены, кодирующие данные субъединицы [5] (Goll 2003). Тем не менее, многие вопросы, касающиеся физиологических функций и механизмов регуляции активности кальпаинов, остаются дискуссионными.

**1.1. Геномная организация и регуляция экспрессии генов µ-, m-кальпаина и кальпастатина**

Нуклеотидная последовательность и структура генов протеаз семейства кальпаинов расшифрована для многих млекопитающих**.** Ниже будет приведена информация относительно строения генов, кодирующих µ- и m-кальпаины человека и крысы.

Ген, кодирующий большую субъединицу µ-кальпаина человека (CAPNS 1), расположен на 11 хромосоме (11q13.1), имеет длину порядка 30 kb и состоит из 25 экзонов. Ген, кодирующий большую субъединицу m-кальпаина человека (CAPN 2) – на 1-й хромосоме (1q41), имеет длину 74 kb и содержит 22 экзона. Ген CAPN 4, кодирующий малую субъединицу кальпаинов, расположен на 19-й хромосоме (19q13.12), имеет длину 11 kb и включает 11 экзонов, причем экзон 1 и частично экзон 11 – это некодирующие последовательности; кодирующая область начинается с 16-го нуклеотида экзона 2 и заканчивается 8-м нуклеотидом экзона 11. Любопытно, что каждая из последовательностей EF-2, -3, -4 и -5 малой субъединицы кодируется определенным экзоном (7, 8, 9 и 10, соответственно) и только последовательность EF-1 – двумя (4-м и 5-м) экзонами [6] (3024120).

Промоторные области генов, кодирующих каталитическую и регуляторную субъединицы кальпаинов, богаты GC повторами и содержат Sp1 (specificity protein1)-, NRF-1 (nuclear respiratory factor)-, AP-1 (activator protein 1)-связывающие сайты, причем транскрипционный фактор NRF-1 является основным транс-регулятором экспрессии гена CAPNS 1 человека [7] (18234454). Судя по данным Hata et al. (1992), инкубация клеток HeLa в присутствии 12-O-тетрадеканоилфорбол-13-ацетата, который через активацию протеинкиназы С (ПКС) действует как опухолевый промотор, вызывает значительное усиление экспрессии гена CAPN 2, но не влияет на экспрессию генов CAPN 1 и CAPNS1 [8] (1618329). Этот факт указывает на существование не только универсальных, но специфических для каждого из описанных выше генов механизмов регуляции экспрессии.

На экспрессию генов, кодирующих субъединицы кальпаинов, также могут влиять однонуклеотидные замены в промоторной области их генов. Например, показано, что замена g.-1256 A>C, ss 1917715340 в промоторной области гена CAPN 1 приводит к значительному усилению продукции µ-кальпаина в сперматозоидах [9] (27107033).

Расположение генов CAPN у крысы иное. Так, ген, кодирующий большую субъединицу µ-кальпаина крысы, длиной 25 kb, находится на 1-й хромосоме (1q43) и включает 25 экзонов. Ген, кодирующий большую субъединицу m-кальпаина крысы (CAPN 2) – на 13-й хромосоме (13q26), имеет длину более 50 kb и содержит 21 экзон. Ген CAPN 4, кодирующий малую субъединицу кальпаинов крысы, расположен на 1-й хромосоме (1q21), имеет длину около 7 kb, включает 9 экзонов. Исследований, посвященных выявлению механизмов регуляции экспрессии данных генов у крысы, практически нет.

К настоящему времени проведено клонирование, секвенирование кДНК кальпастатина многих млекопитающих, в том числе человека, мыши, крысы; определена аминокислотная последовательность и выявлена структура кальпастатина. У человека и некоторых других млекопитающих выявлен один ген кальпастатина, однако, благодаря наличию нескольких промоторов и в результате альтернативного сплайсинга, продуцируется набор изоформ кальпастатина с молекулярными массами от 17,5 кДа до 172 кДа [5] (Goll et al., 2003).

Ген, кодирующий кальпастатин человека (CAST), расположен на 5 хромосоме (5q15), имеет длину порядка 254 kb и состоит из 36 экзонов. Согласно данным UniProt, было обнаружено десять различных транскриптов кальпастатина человека длиной от 590 до 791 аминокислот, являющихся продуктами альтернативного сплайсинга и имеющих различную тканеспецифичность. Активно изучаются однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в гене CAST. Показано, что SNP rs4434401 (Т˃С) в позиции 96.039.025 положительно ассоциирован с развитием кератоконуса (дегенеративного заболевания глаз) с отношением шансов 1,92 [10] (23449483). Кроме этого, в гене CAST человека была обнаружена нонсенс мутация c.544G > T (p.Glu182\*), ассоциированная с развитием лейкохинии [11] (31392520).

Ген, кодирующий кальпастатин крысы, расположен на 2 хромосоме (2q11), имеет длину порядка 110 kb и состоит из 32 экзонов. Уже в 90-х годах XX века для гена кальпастатина крысы была определена полная нуклеотидная последовательность кодирующей области; показано наличие одной рамки считывания, с которой считывается полипептид длиной 603 аминокислоты (полипептиды, соответствующие кальпастатину других млекопитающих, значительно длиннее, например, кальпастатин человека состоит из 694 аминокислот, а мыши – 788 аминокислот). Сравнение аминокислотной последовательности кальпастатина крысы с последовательностями других млекопитающих показало, что гомология составляет около 60%. Было выявлено наличие в аминокислотной последовательности кальпастатина крысы трех делеций по 30-40 аминокислотных остатков [12] (2015306). Позже, согласно данным UniProt, обнаружено три различных транскрипта кальпастатина крысы длиной 713, 690 и 675 аминокислот, являющихся продуктами альтернативного сплайсинга [13] (17570336). В этих последовательностях отсутствуют аминокислоты, соответствующие 3-му экзону, которые участвуют в связывании кальпастатина с плазматической мембраной [14] (15255177). Следовательно, субклеточная локализация кальпастатина крысы и кальпастатина других млекопитающих может различаться.

**1.2. Доменная организация кальпаинов**

Аминокислотная последовательность и кристаллическая структура кальпаинов была определена уже достаточно давно. Первыми кристаллизованы m-кальпаины крысы и человека [15, 16] (10601010; 10639123). Благодаря этим исследованиям стало возможным определение границ функциональных доменов m-кальпаина, а после – и других представителей семейства кальпаинов.

Как уже было сказано выше, m-кальпаин является гетеродимерным белком, состоящим из двух субъединиц: каталитической (молекулярная масса m-кальпаина человека составляет 79,9 кДа, аминокислотная последовательность насчитывает 821 аминокислоту) и регуляторной (молекулярная масса 28 кДа, 268 аминокислот). Обе субъединицы имеют доменную структуру. В составе каталитической субъединицы µ- и m-кальпаинов выделяют от 4-х до 6 доменов [17, 18](14749260; 10666632). Согласно данным, полученным в серии работ Suzuki с коллегами, большая субъединица µ- и m-кальпаинов состоит из четырех доменов (I-IV). Домен I находится в N-концевой части каталитической субъединицы; 19 N-концевых аминокислотных остатка этого домена образуют альфа-спираль и необходимы для заякоривания большой и малой субъединицы кальпаинов путем его взаимодействия с VI доменом. Позже было показано, что С-концевая часть домена I относится к коровой (протеолитической) части протеазы, к которой ранее относили только домен II, что потребовало выделения этой области в отдельный домен. Однако для того, чтобы избежать изменения уже устоявшейся к тому времени нумерации доменов, были введены обозначения «домен IIa» и «домен IIb» [18](10666632).

Домен II (каталитический домен) содержит остатки Cys, His, Asn, которые составляют каталитическую триаду, характерную для цистеиновых протеаз, таких как папаин, бромелаин, катепсины B и H. Домен IIa содержит Cys в положении 115 (для µ-кальпаина человека) или 105 (для m-кальпаина человека), а два других члена каталитической триады – His в положении 272 (µ-кальпаин человека) или в положении 262 (для m-кальпаина человека) и Asn-296 (µ-кальпаин человека) или в положении 286 (для m-кальпаина человека) - находятся в домене IIb. Согласно данным кристаллографических исследований в безкальциевой среде остаток Cys-105 m-кальпаина человека находится на расстоянии 10 Å от остальных остатков, образующих каталитическую триаду (остатков His-262 и Asn-286), что исключает образование функционального комплекса протеазы. Следовательно, должны существовать механизмы «сближения» этих остатков. Действительно, в доменах IIa и IIb были выявлены Са2+-связывающие мотивы длиной 8 и 9 аминокислотных остатков, не относящиеся к EF-hand мотивам; связывание этими мотивами ионов кальция, согласно данным [19], (11893336) приводит к формированию активной каталитической триады. Кроме этого, анализ аминокислотной последовательности позволяет предположить наличие на С-конце IIb домена потенциального кальций-связывающего EF-hand домена, также вовлеченного в процесс активации протеазы. Более подробно возможные механизмы регуляции активности кальпаинов будут обсуждены ниже.

В отличие от домена I, для которого степень гомологии для человека, крысы, цыпленка и кролика составляет 72-86%, для домена II она уже 85-93%, причем последовательность Са2+-связывающих мотивов у млекопитающих и птиц полностью идентична [19] (11893336). В совокупности эти данные свидетельствует о высокой консервативности каталитического домена и необходимости связывания кальция для активации протеазы.

Домен III служит связующим звеном между каталитическим доменом и доменом IV; содержит в своей структуре бета-сэндвич, состоящий из 8 бета-цепей, образующих С2-подобный (С2L – С2-like) мотив, который даже получил название Calpain-type beta-sandwich (CBSW) домен (calpain.net/3dstructure). Этот домен впервые был обнаружен у ПКС, для которой было показано, что он выполняет функцию Са2+-зависимого мембранного якоря и обеспечивает взаимодействие киназы с фосфолипидами плазматической мембраны, приводящее к активации киназного домена [20, 21] (15851022; 22453964). Аналогичная функция этого домена была показана и для кальпаинов: за счет C2L домена реализуется кальций-зависимое связывание кальпаинов с плазматической мембраной, облегчающее процесс активации протеазы [22] (15180595). Кроме этого, показана возможность электростатического взаимодействия между кластером основных аминокислот домена IIb и кислых - домена IIIб, причем ослабление данного взаимодействия средствами сайт-направленного мутагенеза приводит к «облегчению» активации кальпаинов [22](15180595).

Домен IV. Аминокислотная последовательность этого домена гомологична кальмодулину (Ca2+-связывающий белок эукариот), содержит пять Ca2+-связывающих EF-hand мотивов и, следовательно, относится к PEF (penta-EF-hand) доменам. Четыре из указанных выше EF-hand мотива способны связывать кальций, а последний – нет, но он, как и домен I, обеспечивает ассоциацию большой и малой субъединицы протеазы за счет взаимодействия с доменом VI [23] (23035980). Интересно, что активность рекомбинантного µ-кальпаина, лишенного IVдомена, не зависит от содержания кальция в среде, а его замена на IV домен m-кальпаина приводит к увеличению сродства к ионам кальция и восстанавливает зависимость активности протеазы от содержания кальция в среде [24, 25] (9325309; 30877334). Межвидовая гомология аминокислотной последовательности, соответствующей этому домену, составляет около 90%.

Домен V является N-концевым доменом малой регуляторной субъединицы кальпаинов. Аминокислотная последовательность, соответствующая этому домену, чрезвычайно богата глицином. Например, в составе малой субъединицы кальпаинов человека из 268 аминокислот – 51 остаток глицина, причем в цепи подряд расположено два кластера, состоящих из 11 и 20 остатков глицина. Следовательно, данный домен является гидрофобным, и, вероятно, участвует в связывании малой субъединицы кальпаинов с фосфолипидами плазматической мембраны. Данная гипотеза находит подтверждение в работе Dennison SR с коллегами (2005). Они показали, что связывание с мембраной происходит за счет образующего альфа-спираль мотива GTAMRILGGV, следующего сразу за вторым глициновым кластером, а сам кластер лишь стабилизирует данное взаимодействие [26] (15653743). Эта область характеризуется высокой степенью межвидовой гомологии (от 93% до 100%), что свидетельствует о крайней необходимости описанных выше мотивов для нормального функционирования протеаз семейства кальпаинов. В более поздних исследования на 16 хромосоме человека в локусе 16q12.2 был обнаружен безынтронный ген, кодирующий повсеместно экспрессирующуюся «неклассическую» малую субъединицу кальпаинов (CSS2 – calpain small subunit 2), состоящую из 248 аминокислот. Затем продукция данного пептида была обнаружена и у других млекопитающих. Этот пептид, в отличие от классической малой субъединицы, не содержит мотивы из 11 и 20 остатков глицина и, как следствие, в слабой степени связывается с каталитической субъединицей кальпаинов [27, 28] (11853546; 15078555).

Через полипролиновый линкер домен V соединяется с доменом VI, который гомологичен домену IV каталитической субъединицы и также содержит пять EF-hand мотивов [29] (9441591). Данный домен, как уже сказано выше, вовлечен в процесс ассоциации большой и малой субъединиц кальпаинов, которая обеспечивается пятыми EF-hand мотивами каждого из доменов. С этим же доменом взаимодействует N-концевой участок домена I.

Для всех известных изоформ кальпастатина также характерна доменная организация. Считается, что молекула кальпастатина состоит из N-концевого L-домена, размер которого варьируется, благодаря альтернативному сплайсингу, и четырех повторяющихся доменов (I - IV) протяженностью 140 аминокислотных остатков. В свою очередь, каждый домен состоит из трех высококонсервативных субдоменов, обозначаемых A, B и C [5] (Goll et al., 2003). Для кальпастатина некоторых млекопитающих, например, для кальпастатина быка, показано наличие дополнительного XL-домена. Ранее считалось, что наличие этого домена не характерно для грызунов, однако в 2007 г. вариант молекулы кальпастатина, содержащий XL-домен был обнаружен и у крысы [13] (17570336). L-домен участвует в связывании кальпастатина с мембраной и не обладает ингибиторной активностью. Ингибиторные свойства кальпастатина определяются субдоменом В, а субдомены A и C в присутствии ионов Ca2+ связываются с IV и VI доменами кальпаина соответственно, и увеличивают ингибиторную активность субдомена B. В составе субдомена В содержится высококонсервативная последовательность LGXK(R)D(E)XYIPPXYRXLL, которая, определяет ингибиторные в отношении кальпаинов свойства кальпастатина, но сама по себе она обладает низкой ингибиторной активностью [14] (15255177).

**1.3. Регуляция активности кальпаинов**

В отсутствии ионов кальция в среде аминокислотные остатки, образующие каталитическую триаду кальпаинов (для µ- кальпаина – это Cys-115, His-272 и Asn-296), находятся на значительном расстоянии друг от друга (около 10 Å), что делает невозможным депротонизацию тиола цистеина остатком гистидина и, как следствие, протеаза находится в неактивном состоянии.

Еще до получения данных рентгеноструктурного анализа на основании аминокислотной последовательности кальпаинов был предложен следующий механизм активации протеаз данного семейства: связывание Ca2+ EF-hand мотивами, находящимися в С-концевой части регуляторной и каталитической субъединицы кальпаинов, вызывает конформационные перестройки в структуре димера; в результате таких перестроек от N-конца каталитической субъединицы автолитически отщепляются первые 19 аминокислотных остатков (домен I); аминокислотные остатки, образующие каталитическую триаду, сближаются; протеаза переходит в активное состояние.

В конце 80-х годов XX-го века было получено частичное экспериментальное подтверждение описанного выше механизма, а также показано, что скорость автолиза µ-кальпаина прямо пропорциональна концентрации самой протеазы и обратно пропорциональна концентрации продуктов протеолитического расщепления ее субстратов [30] (2848841). Таким образом, уже к этому времени не оставалось сомнений, что активация кальпаинов in vitro происходит исключительно в присутствии ионов кальция в среде, причем в достаточно большой «нефизиологической» их концентрации, что оставляет открытыми множество вопросов о регуляции активности кальпаинов. Поэтому в дальнейшем каждое звено в описанной выше гипотетической схеме активации кальпаинов будет подвергнуто сомнению и не найдет 100% экспериментального подтверждения.

В первую очередь был подвергнут сомнению тезис о конформационных перестройках в структуре кальпаинов после связывания Ca2+ EF-hand мотивами, находящимися в С-концевой части регуляторной и каталитической субъединицы. Подобные перестройки характерны для кальмодулина, но, как оказалось, не для кальпаинов. С помощью создания рекомбинантного µ-кальпаина крысы, лишенного EF-hand мотивов, было показано, что для активации такого модифицированного кальпаина достаточно связывания кальция двумя Са2+-связывающими мотивами в доменах IIa и IIb. При этом для формирования активного цента наличие EF-hand мотивов не является обязательным. Однако активность модифицированного µ-кальпаина была несколько ниже, чем у кальпаина дикого типа, что авторы связывают с отсутствием в его структуре III-го домена, который необходим для «стабилизации» протеазы в активированном состоянии [19] (11893336). Позднее авторы данного исследования выдвинули гипотезу о двухстадийном процессе активации кальпаинов. На первой стадии происходят конформационные изменения в доменах IV и VI, способствующие диссоциации N-концевого якорного пептида от малой субъединицы; затем происходят конформационные изменения в домене III, возможно, малая субъединица диссоциирует от большой; якорный пептид отщепляется путем автолиза. На второй стадии происходит перестройка активного цента протеазы, вызванная связыванием ионов кальция с Са2+-связывающими мотивами в доменах IIa и IIb [31] (14581465). Однако остается неразрешенным вопрос о механизмах инициации конформационных изменений в доменах IV и VI и о роли EF-hand мотивов в процессе активации протеаз данного семейства. Исследований, посвященных этому вопросу, немного. В одном из них было показано, что именно связывание Ca2+ со вторым EF-hand мотивом на малой субъединице кальпаинов, структурно расположенного напротив якорного участка домена I, вызывает отталкивание положительно заряженных аминокислот в его составе, тем самым облегчая диссоциацию якорного пептида от малой субъединицы [32] (11686922). Также показана возможность распространения конформационных перестроек от EF-hand мотивов IV домена через линкерный пептид на IIb домен и C2L мотив, которые обеспечивают стабилизацию протеазы в активном состоянии [33] (19020623). Возможно и прямое влияние. Например, связывание Са2+ третьим EF-hand мотивом на большой субъединице нарушает электростатическое взаимодействие между Glu-626 и Lys-629 с последующим формированием водородной связи между Lys-629 и Ile-446 в составе C2L мотива. Такая перестройка способствует дополнительной стабилизации активного цента протеазы [34] (23259318). Вероятнее всего, функция EF-hand мотивов состоит в обеспечении дополнительного уровня защиты протеаз от случайной или чрезмерной активации.

В ряде работ было показано, что протеолитическая активность µ- и m-кальпаина регулируется за счет их ассоциации с фосфолипидами плазматической мембраны. Например, µ-кальпаин, выделенный из скелетных мышц, «требовал» 40-50 мкМ Ca2+ для полумаксимальной скорости протеолиза своего субстрата - казеина; 140-150 мкМ Ca2+ для полумаксимальной скорости автолиза в присутствии 80 мкМ фосфатидилинозитола и 190-210 мкМ Ca2+ - для полумаксимальной скорости автолиза в отсутствие фосфолипидов. Для m-кальпаина, выделенного из скелетных мышц крупного рогатого скота, требовалось 700-740 мкМ Ca2+ для полумаксимальной скорости протеолиза казеина, 370-400 мкМ Ca2+ - для полумаксимальной скорости автолиза в присутствии 80 мкМ фосфатидилинозитола и 740-780 мкМ Ca2+ - для полумаксимальной скорости автолиза в отсутствие фосфолипидов. Исходя из этих данных, вероятнее всего, m-кальпаин функционирует в автолизованной, а µ-кальпаин – в неавтолизованной форме, а фосфолипиды, в первую очередь, «снижают» концентрацию Са2+, необходимую для автолиза [35] (2542320). Последующие исследования показали, что комбинация фосфатидилинозитола с различными ганглиозидами, цереброзидами и сульфатидами более эффективно снижает концентрацию Са2+, необходимую для активации m-кальпаина, максимальное снижение наблюдалось при использовании комбинации GD1a (100 мкМ) и цереброзида (750 мкМ) [36] (8739157). Однако механизмы наблюдаемого в эксперименте снижения потребности кальпаинов в Са2+ раскрыты не были. Ясно было одно - для того, чтобы активироваться при взаимодействии с мембраной, кальпаины должны иметь возможность связаться с ней при более низкой концентрации Са2+, чем она требуется для их активации.

Для выявления Са2+-зависимых механизмов связывания кальпаинов с мембраной были использованы рекомбинантные кальпаины с нарушенной структурой активного центра или не способные к автолизу, но претерпевающие аналогичные с немодифицированной молекулой конформационные изменения; анализировалось их взаимодействие с липосомами. Оказалось, что взаимодействие µ-кальпаина с мембраной обусловлено увеличением гидрофобности молекулы, наблюдаемой во время активации протеазы. Константа диссоциации (Kd) образуемого белок-липидного комплекса близка к Kd, характерной для ПКС, имеющей в своей структуре С2 домен, что указывает на участие в образовании белок-липидного комплекса С2L домена кальпаинов [37] (16740134). Предложенный механизм взаимодействия кальпаинов с мембраной позволяет также объяснить выявленную ранее способность m-кальпаина встраиваться в мембраны органелл подобно интегральным мембранным белкам [38] (15302874).

Делеция V домена в структуре µ-кальпаина человека приводит к 10-ти кратному снижению способности протеазы связываться с плазматической мембраной, а аминокислотные замены в «кислой» петле III-го домена, содержащего С2L-мотив, напротив, никак не отражаются на аффинности данной протеазы к плазматической мембране, но снижают потребность в Са2+, необходимой для активации протеазы [37, 39] (16740134, 14976200). Вероятнее всего, взаимодействие кальпаинов с мембраной не способствует активации кальпаинов, а лишь является механизмом стабилизации или же концентрирования нескольких активированных молекул кальпаинов для облегчения протеолитического расщепления связанных с мембраной субстратов

Отдельного обсуждения требует роль **автолиза** в процессе активации кальпаинов. Существует ряд исследований, убедительно показывающих, что автолитическое отщепление N-концевого домена (домена I) от каталитической субъединицы µ- или m-кальпаина существенно снижает концентрацию Cа2+, необходимую для активации этих протеаз (например [35, 40] 2542320, 8836135 и мн.др.). Однако следует отметить, что сайт автолитического расщепления в значительной мере удален от активного центра протеазы, и поэтому в процесс его отщепления неизбежно должна вовлекаться еще одна молекула µ- или m-кальпаина, а для этого она должна быть активирована. Этот факт ставит под сомнение гипотезу об автолизе как необходимом звене процесса активации кальпаинов. Предполагается, что автолиз происходит при выделении и очистке кальпаинов, когда в условиях in vitro искусственно достигается высокая концентрация протеазы, а в физиологических условиях автолиз либо вообще не происходит, либо имеет другое функциональное значение.

За последние 20-30 лет были накоплены данные, подтверждающие и опровергающие данную гипотезу. К первой группе исследований относятся следующие. В 1997 году с помощью сайт-направленного мутагенеза был получен не способный к автолизу, но проявляющий протеолитическую активность, m-кальпаин [41] (9111030). Позже появились данные, что неавтолизованный кальпаин является активной протеазой [42](11517929), а процессы активации и автолиза протекают абсолютно независимо [43] (8999893). Более того, за счет домена I осуществляется взаимодействие большой и малой субъединицы кальпаинов и, строго говоря, пока эти субъединицы ассоциированы, сайт автолитического расщепления защищен от гидролиза и становится доступным (но не обязательно отщепленным) для протеаз только после диссоциации каталитической и регуляторной субъединицы. При такой последовательности событий (отсутствие необратимого протеолитического отщепления якорного пептида) существует вероятность многократных циклов ассоциации-диссоциации этих субъединиц, что может рассматриваться как еще один механизм регуляции активности кальпаинов [34] (23259318). Однако эта гипотеза оспаривается рядом авторов. Например, показано, что в присутствии ионов кальция в концентрации достаточной для активации протеазы (в отсутствии в среде кальпастатина) обе субъединицы m-кальпаина остаются ассоциированы друг с другом [33, 44] (9801150; 19020623).

Во второй серии работ убедительно показано наличие автолизованного кальпаина не только in vitro, но и iv vivo. Например, инкубация в течение 5 минут эритроцитарного µ-кальпаина человека в безсубстратном растворе, содержащем 100 мкМ Са2+, приводила к образованию путем автолиза укороченной каталитической субъединицы с молекулярной массой 75 кДа, а при увеличении времени инкубации до 20 минут ее содержание снижалось, причем добавление в инкубационную среду рекомбинантного кальпастатина, лишенного ингибиторной активности в отношении µ-кальпаина, отменяло последний эффект [45] (29572388). Эти же авторы в лизатах клеток менингиомы человека, полученных при оперативном удалении опухолей, в шести из девяти образцов обнаружили полноразмерную 80кДа субъединицу и ее автолизованную 75 кДа форму в различных соотношениях; в трех образцах присутствовала только полноразмерная молекула [45] (29572388). Следовательно, автолитическое расщепление каталитической субъединицы µ-кальпаина происходит in vivo, причем в зависимости от условий (в том числе от содержания эндогенного кальпастатина и/или его особой формы, лишенной ингибиторной активности) интенсивность данного процесса меняется. Таким образом, автолитическое расщепление каталитической субъединицы кальпаинов, несомненно, имеет определенное, но еще не до конца изученное физиологическое значение. Например, обсуждается, что именно с автолизованной формой кальпаина связывается «особая», лишенная ингибиторной активности молекула кальпастатина, тем самым, препятствуя деградации активного кальпаина [46] (30959065).

В ряде работ конца ХХ века описываются молекулы, которые могут в условиях in vivo «повышать» активность кальпаинов. Среди них выделяют: изовалерилкарнитин; термостабильный 45кДа-пептид, выделенный из нейтрофилов человека; 45кДа белок-активатор, выделенный из эритроцитов, а также Ацетил-КоА связывающий белок, UK114-подобный белок, ФРФ и др., в том числе, как это не парадоксально, и кальпастатин [5] (Goll et al, 2003). Эти белки условно можно разделить на две группы: белки, снижающие потребность кальпаина в Са2+, необходимой для активации, и белки, увеличивающие каталитическую активность кальпаина, но не влияющие на требуемую для активации концентрацию Са2+. К белкам первой группы, например, относят ацил-КоА связывающий белок, который снижает Са2+ потребность кальпаина до 6-7 µМ, а к белкам второй группы - эпидермальный фактор роста фибробластов (ФРФ) и BDNF, чьи эффекты опосредуются через ERK-киназу, фосфорилирующую Ser-50 в составе m-кальпаина [47, 48] (14993287; 20089917); к обратному эффекту (подавлению активности кальпаина) приводит фосфорилирование Ser-369 и Thr-370 ПКА [49] (12729909), причем описанные выше эффекты были характерны только для m-кальпаина. На сегодняшний день идентифицировано 8 сайтов фосфорилирования для m- и 9 – для µ-кальпаина, которые сгруппированы в двух областях молекулы: на границе доменов I и IIa (в положении 77-81 для µ-кальпаина и в положении 50, 66-70 - для m-кальпаина); в домене IIb (в положении 360-380 для µ-кальпаина и в положении 316-370 для m-кальпаина). Это сайты фосфорилирования для ПКА, ПКС, ПКG, ККII, ERK [50] (28888457). Однако физиологическое значение фосфорилирования показано не для всех сайтов. Кроме сайтов, о которых говорилось выше (Ser-50, Ser-369 и Thr-370), существуют данные о том, что дефосфорилирование молекулы µ-кальпаина щелочной фосфатазой облегчает автолитическое расщепление протеазы и увеличивает скорость ее деградации [50, 51] (28888457; 29478550). Таким образом, как минимум для одного класса белков-активаторов кальпаина характерен механизм действия посредством введения посттрансляционных модификаций, таких как фосфорилирование.

Еще один механизм повышения активности кальпаинов - без влияния на потребность протеазы в Са2+ - был показан для БТШ 90. Оказалось, что БТШ 90 образует комплекс с µ-кальпаином (но не m-кальпаином), причем последний при этом сохраняет свою активность, так как каталитическая триада не участвует в ассоциации. Однако образование этого комплекса препятствует взаимодействию µ-кальпаина с кальпастатином, следовательно, возникновение комплекса µ-кальпаин-БТШ 90 предотвращает ингибирование протеолитической активности даже в присутствии высоких концентраций кальпастатина [52] (25575026).

Основным эндогенным регулятором активности кальпаинов, как уже было сказано выше, является кальпастатин. Связывание кальпаина с кальпастатином происходит при физиологической концентрации ионов Са2+, а значит кальпастатин может связаться с неактивированным кальпаином, что и было обнаружено Melloni E с коллегами [53] (16803906). Следовательно, должен существовать механизм поддержания кальпаина в активном состоянии в присутствии кальпастатина. Обсуждается ряд возможных механизмов регуляции кальпаин-кальпастатинового взаимодействия, однако общепринятого мнения на этот счет не существует.

Для эффективного подавления активности кальпаинов необходимо, чтобы кальпастатин связался с молекулой кальпаина по трем сайтам: субдомен A кальпастатина - с доменом IV кальпаина (Са2+-зависимым образом), субдомен C - с доменом VI кальпаина (Са2+-зависимым образом), субдомен B - с близкой к активному центру областью кальпаина [5] (Goll et al., 2003). Однако синтетические пептиды, соответствующие субдоменам А и С, не обладают ингибиторной активностью, не влияют на степень автолиза кальпаина, но влияют на способность кальпаина связываться с клеточной мембраной и, тем самым, регулируют протеолитическую активность. Показано, что одна молекула кальпастатина может ингибировать до четырех молекул µ-кальпаина [54] (15032436); при этом наиболее выраженное ингибирование µ-кальпаина кальпастатином проявляется для протеазы, фосфорилированной ПКА [55] (30373003).

Интересный факт был обнаружен Tompa c сотрудниками [56] (11809743): синтетические пептиды, соответствующие субдоменам А и С кальпастатина, напротив, оказались способны активировать μ-кальпаин эритроцитов человека и m-кальпаин крысы. Поскольку известно, что кальпастатин подвергается протеолитическому расщеплению некоторыми протеазами, в том числе и кальпаином [57] (10854849), авторы считают, что фрагменты кальпастатина могут образовываться в клетке in vivo и активировать кальпаин.

Недавно in vivo обнаружили особую форму кальпастатина с усеченным L доменом, который авторы обозначили как L-DOM-кальпастатин [13](17570336). Было показано, что эта форма кальпастатина связывается с неавтолизованной (80 кДа) каталитической субъединицей кальпаина в отсутствии ионов кальция в среде. При инкубации автолизованного µ-кальпаина (75 кДа) с неавтолизованным (80 кДа) в присутствии 5 мкМ Са2+ (этого недостаточно для автолиза µ-кальпаина, но достаточно для поддержания автолизованного µ-кальпаина в активном состоянии) наблюдается постепенная деградация молекулы кальпаина 80 кДа без активации протеазы. Если же в инкубационной смеси заменить неавтолизованный кальпаин на комплекс, то деградации 80 кДа-µ-кальпаина под действием 75 кДа µ-кальпаина не происходит. Следовательно, в присутствии относительно низкой концентрации кальция в среде L-DOM-кальпастатин предотвращает деградацию неавтолизованного µ-кальпаина, увеличивая тем самым клеточный «запас» способного к активации кальпаина [45] (29572388).

Таким образом, к настоящему времени накоплены данные об участии в регуляции активности кальпаинов ионов Ca2+, белков-активаторов, кальпастатина, фосфолипидов плазматической мембраны клетки и мембран ее органелл; предложен ряд гипотетических механизмов регуляции активности кальпаинов, однако остается неясным, насколько близок к истине каждый из них.

**1.4. Субстратная специфичность кальпаинов**

Считается, что физиологическая роль кальпаинов полностью определяется их способностью к протеолизу. На сегодняшний день идентифицировано более 100 белков-субстратов кальпаина. Среди них транскрипционные факторы, трансмембранные рецепторы, различные ферменты, белки цитоскелета, синаптосомальные белки. Некоторые субстраты подвергаются полной деградации под действием кальпаинов, а большинство – ограниченному протеолизу. В результате такого протеолиза образуются стабильные белковые фрагменты, которые теряют свойства целой молекулы и приобретают новые, иногда противоположные функции [58](11517927).

Если аминокислотные остатки, образующие пептидную связь, расщепляемую кальпаинами, представить в виде р4-р3-р2-р1—р1’-р2’-р3’-р4’, то, согласно первоначальным исследованиям, кальпаины предпочтительно расщепляют пептидные связи с лейцином или валином в р2 положении. Однако в более поздних работах продемонстрирован лишь косвенный «эффект» аминокислотного остатка субстрата на специфичность кальпаинов: расщепление происходит и по отрицательно заряженным, и по положительно заряженным, и по полярным аминокислотным остаткам. Еще в 1997 году была проведена серия исследований с помощью метода сайт-направленного мутагенеза, когда в положение р2 альфа II спектрина поочередно вводили 20 протеиногенных аминокислот: введение аргинина, валина или аланина в положение р2 способствовало, а аспарагиновой кислоты, пролина и гистидина – препятствовало расщеплению данного субстрата m-кальпаином. При этом отмечалось, что в первом случае замены приводили к разрушению третичной структуры субстрата, а во втором, напротив, - к ее стабилизации. Следовательно, специфичность протеолиза обеспечивается не первичной структурой субстрата, а наличием у него определенной конформации [59] (8993318). Тем не менее, некоторые «предпочтения» в отношении аминокислотного состава субстрата в области его расщепления кальпаинами были обнаружены. Например, в позиции р3 предпочтительно нахождение фенилаланина / триптофана/ лейцина/ валина, р2 – лейцина/ валина, р1 – аргинина/ лизина, р1’ – аргинина/ лизина/ лейцина. Мета-анализ работ, посвященных субстратной специфичности кальпаинов, позволил построить позиционно весовую матрицу (ПВМ) для аминокислотных остатков р30-р30’ [60] (21559271). С использованием ПВМ была предсказана наиболее оптимальная последовательность аминокислот в позиции р5-р3’: PF[F( > L > P)][L( > V)][L/F]- | -[M( > A > R)]E[R( > K)], где «|» - сайт расщепления [61] (22944687). Оказалось, что такой пептид (PLFAER) расщепляется µ-кальпаином в 18 раз быстрее, чем пептид, соответствующий сайту расщепления в молекуле альфа-спектрина (EVYGMM), и в 300 раз быстрее, чем синтетический субстрат, используемый для определения активности кальпаинов (SLY-MCA). Парадоксально, но эта «идеальная» для субстрата кальпаинов последовательность в базах данных эукариотических белков не найдена. Поэтому позже на его основе с целью определения активности кальпаинов in vivo были разработаны два олигопептида, которые расщеплялись µ- и m-кальпаином, но не трипсином, химотрипсином, катепсином и каспазами [62, 63] (29104086; 30617794).

С целью выявления субстратной специфичности кальпаинов была создана библиотека уже выявленных субстратов кальпаинов. На основании анализа этой библиотеки синтезировали флуоресцентный олигопептид – субстрат кальпаинов (H-E(EDANS)PLFAERK (DABCYL)-OH), который используют для анализа активности кальпаинов [64] (16216885).

Также были предприняты попытки выявить закономерности аминокислотного состава субстратов кальпаина, основываясь на 3D-структуре кальпаинов. Однако такой метод, как оказалось, позволяет анализировать только сайты p4’, p5’, p7’ и p9’. Еще один подход к поиску специфических для кальпаинов сайтов расщепления основан на анализе взаимодействия кальпаинов и кальпастатина с применением метода машинного обучения. Он оказался весьма успешным. Полученные данные обобщены и суммированы в [61] (22944687).

Позже для этих же целей был применен метод Поиска количественных соотношений структура-свойство (совместное использование методов математической статистики и машинного обучения для решения задачи классификации). Авторы тестировали синтетические двадцатичленные олигопептиды, соответствующие р10-р10’, и обнаружили 483 последовательности, которые расщеплялись кальпаинами, 360 из них были выявлены впервые [65] (26796116).

Также исследовалась специфичность действия µ- и m-кальпаина, и было показано полное совпадение продуктов протеолиза µ- и m-кальпаином альфа-тропомиозина и бета-казеина, но скорость образования этих продуктов зависела от вида протеазы [66] (11504070). Однако на степень расщепления субстратов кальпаинами влияет наличие посттрансляционных модификаций. Например, фосфорилирование тропонина I ПКА снижает чувствительность к действию µ-кальпаина, а фосфорилирование этого же субстрата ПКС, напротив, увеличивает чувствительность [67] (7755588).

Таким образом, нет убедительных данных о структуре канонической последовательности расщепления кальпаинами. Данные о наличии в структуре белка сайта расщепления кальпаинами, полученные с помощью методов in silico, носят выраженный вероятностный характер и требуют дополнительного экспериментального подтверждения. Однако в основе недавно разработанных алгоритмов лежат методы математической статистики, имеющие высокую предсказательную силу, что позволяет опираться на полученные с их помощью данные при построении гипотетических схем.

**1.5. Тканевая локализация кальпаинов**

Кальпастатин, μ-кальпаин или m-кальпаин обнаруживаются во всех типах клеток млекопитающих, но их соотношение варьирует в зависимости от типа клетки. Например, в некоторых клетках присутствует только одна из протеаз и кальпастатин: эритроциты и тромбоциты человека не содержат μ-кальпаина, но в них продуцируется m-кальпаин и кальпастатин, а в тромбоцитах быка и крысы выявляется только μ-кальпаин и кальпастатин (для обзора [5] Goll et al., 2003). Кальпаины и кальпастатин обнаруживаются в лимфоидных клетках, причем в активированных Т-клетках человека преобладает m-кальпаин [68] (12150984). Клетки почек, селезенки, скелетных мышц крысы и других млекопитающих содержат приблизительно равные количества μ- и m-кальпаина; в клетках сердечной мышцы преобладает m-кальпаин и кальпастатин, гладкие мышцы тоже практически не содержат μ-кальпаина [69, 70] (16125114; 31219776). Высокий уровень кальпаинов и кальпастатина выявлен в клетках плаценты млекопитающих, а также в яйцеклетках и сперматозоидах [71] (21791606).

Особый интерес вызывает распределение кальпаинов и кальпастатина в различных отделах ЦНС млекопитающих. Работ, посвященных этой теме, довольно много, в них исследуется представленность компонентов кальпаиновой системы на уровне или мРНК, или белка, или активности протеаз методами различной чувствительности и специфичности. Однако ни в одном из обнаруженных в базе NCBI исследований на всех уровнях одновременно (мРНК, белок, активность) кальпаины не исследовались. В работе Li et al. (1995) у мышей в гиппокампе, коре головного мозга, мозжечке и в спинном мозге анализировали исключительно уровень мРНК µ- и m-кальпаина. Оказалось, что максимальное содержание обеих протеаз наблюдается в клетках спинного мозга; высокий уровень мРНК m-кальпаина обнаруживался в клетках Пуркинье мозжечка; в клетках коры и гиппокампа уровень мРНК µ- и m-кальпаина было примерно одинаковым [72] (8738748). С помощью метода гибридизации in situ проанализировано распределение мРНК кальпаинов в мозге крысы. Оказалось, что для клеток коры характерная слабая продукция мРНК m-кальпаина, а в клетках гиппокампа, голубого пятна и клетках Пуркинье мозжечка продукция данной протеазы была от слабой до умеренной. В среднем и заднем мозге мРНК m-кальпаина детектировалась преимущественно в красном ядре и в большинстве ядер черепных нервов. В сером веществе спинного мозга уровень мРНК m-кальпаина был слабым, а в нейронах передних рогов – высоким [73] (8028482). В другой работе уже методом ОТ-ПЦР был определен уровень мРНК µ- и m-кальпаина в стволе, мозжечке, коре и спинном мозге крыс линии Спрег-Доули. Максимальное содержание мРНК обоих кальпаинов наблюдалось в клетках спинного мозга, а минимальное – в коре, при этом только в стволе и в спинном мозге отношение мРНК µ-кальпаин/мРНК m-кальпаин было больше единицы [74] (9710268).

Одновременно на уровне белка (методом Вестерн блоттинга) и мРНК (методом ОТ-ПЦР) содержание кальпаинов и кальпастатина в целом мозге крысы в онтогенезе анализировалось в работе Li Y с коллегами (2009). Оказалось, что с Е18 до Р90 содержание µ-кальпаина и кальпастатина увеличивается на 75%, причем максимальная скорость нарастания наблюдается с Р10 до Р20; в анализируемый период содержание m-кальпаина практически не меняется. При этом уровень мРНК µ-кальпаина и кальпастатина с Е18 до Р90 дня развития увеличился в 2,5 раза, а m-кальпаина – не изменился [75] (19751724). На взрослых животных методами иммуногистохимии показано наличие μ-кальпаина в клетках Пуркинье, пирамидальных нейронах гиппокампа и нейронах неокортекса, при этом m-кальпаин был наиболее представлен в клетках глии [76] (2358536). В работе Friedrich P с коллегами в мозге крысы методом иммуногистохимии анализировалось содержание двух изоформ малой субъединицы кальпаинов – CSS1 и CSS2. CSS1 выявлялась в перикариальной области, а CSS2 – в аксонах пирамидальных нейронов гиппокампа и нейронов гранулярного слоя зубчатой извилины; CSS1 обнаруживалась в теле клетки и в дендритах, а CSS2 - в аксонах пирамидальных клеток коры [28] (15078555).

Общепризнано, что кальпаины и кальпастатин локализуются исключительно внутриклеточно [5] (Goll et al., 2003), но субклеточная локализация m- и μ-кальпаина различна и зависит от типа клетки и ее функционального состояния. Например, в нейронах μ-кальпаин обнаруживается в дендритах и теле клетки, а m-кальпаин - в аксонах [76] (2358536). Однако в более поздних исследованиях показано, что и μ-, и m-кальпаин выявляются в области постсинаптического уплотнения и в дендритных шипиках нейронов [77, 78] (23707799, 25437879).

Внутриклеточная локализация кальпаинов, согласно данным нескольких исследовательских групп, меняется в зависимости от функционального состояния клетки. При некоторых условиях кальпаины визуализируются диффузно в цитоплазме, или вблизи плазматической мембраны, или вблизи мембран органелл, или же присутствуют в детергент-устойчивых сигнальных доменах плазматической мембраны – рафтах [68] (12150984). Например, на клетках COS7 показано, что в отсутствии каких-либо внешних воздействий кальпаины и кальпастатин диффузно распределены в цитоплазме; после обработки клеток ионофором кальция кальпаин обнаруживается вблизи плазматической мембраны, а локализация кальпастатина не меняется [79] (12591934). В T-лимфоцитах человека, активированных различными фармакологическими агентами, также выявлено перемещение активированного кальпаина из цитоплазмы к плазматической мембране [80] (9407132).

Несмотря на то, что способность компонентов кальпаиновой системы к перемещению внутри клетки уже давно описана, пространственно-временные аспекты регуляции этой «миграции» до сих пор не изучены, определены лишь некоторые стимулы, вызывающие транслокацию кальпаинов. Например, связывание m-кальпаина с липидами в составе рафтов происходит только при наличии в среде 20 мМ (или больше) СаСl2, и практически полностью предотвращается добавлением 100 мкМ кальпептина [68] (12150984). Увеличение концентрации Са2+ в цитоплазме вызывает перемещение кальпаинов в область клетки, обогащенную белками цитоскелета, например, в конусы ростов нейритов [58, 81] (11517927; 31344270). Hood с коллегами (2003) с помощью метода конфокальной микроскопии показали, что при инкубации клеток SNB19 (клетки глиомы) на ламининовой подложке µ-кальпаин распределен в цитоплазме диффузно и присутствует в области псевдоподий в минимальных количествах; m-кальпаин, напротив, преимущественно обнаруживается в области псевдоподий, при этом в клетках данной линии отношение содержания m-/µ- кальпаина значительно больше единицы [82, 83] (14559243; 16927317). Этой же исследовательской группой было показано, что µ-кальпаин, 78 кДа субъединица m-кальпаина и CSS-субъединица способны встраиваться в мембраны эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи по типу интегральных белков [38] (15302874).

В ряде исследований продемонстрирована митохондриальная локализация кальпаинов. Например, еще в 1991 г. появилось сообщение об идентификации кальпаин-подобной активности в матриксе и межмембранном пространстве митохондрии гепатоцитов крысы [84] (1801718). В митохондриях, выделенных из разных тканей, содержание µ-кальпаина отличается: представленность µ-кальпаина в митохондриях гепатоцитов значительно ниже, чем в митохондриях, выделенных из коры головного мозга крысы [85] (19393648). µ-кальпаин также обнаруживался в митохондриях кардиомиоцитов, причем его содержание увеличивается при экспериментальном повреждении миокарда у крыс [86] (30874894). M-кальпаин тоже был обнаружен в митохондриях кардиомиоцитов и гепатоцитов, причем в последних в связанном с глюкозо-регулирующим белком 75 кДа состоянии [87, 88] (19833151; 26113472). Кальпастатин выявлялся на внутренней мембране, но не в матриксе и не в межмембранном пространстве митохондрий [89, 90] (17646173; 18082616). Перемещение кальпаинов в митохондрии может быть вызвано развитием патологического процесса, например, увеличением содержания агрегатов амилоида. Действительно, интрацеребральное введение пептида Aβ25–35 крысам приводило к транслокации µ- и m-кальпаина из цитоплазмы в митохондрии с последующим высвобождением из митохондрий катепсина B и D, а также β-галактозидазы [91] (21029727).

Немногочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют о внеклеточной локализации кальпаинов. Deshpande с коллегами выявили, что стимуляция лимфоидных клеток линии U-937, THP-1 форболовым эфиром совместно c Са2+-ионофором, приводит к секреции кальпаина в культуральную среду, добавление которой к выделенным из миелина белкам приводит к протеолитическому расщеплению основного белка миелина [92] (8568927).

Исследования клеток карциномы человека NCI-H69 показали, что основной компонент сигаретного дыма нитрозамин инициирует фосфорилирование и стимулирует секрецию активированных μ- и m-кальпаина во внеклеточную среду. При этом и секреция, и фосфорилирование кальпаинов под действие нитрозамина подавляется PD98059 (ингибитор MEK/ERK сигнального пути) и ботулотоксином [93] (15471877).

На клетках линии N27 (линия дофаминергических нейронов) было показано, что их обработка MPTP (1-methyl-4-phenylpyridinium – селективный для дофаминергических нейронов нейротоксин - МПТП) вызывает высвобождение кальпаина в культуральную среду. При добавлении внеклеточной жидкости, содержащей кальпаин, к культуре глиальных клеток наблюдается активация последних, что, в свою очередь, оказывает токсическое действие преимущественно на дофаминергические нейроны [94] (20123724).

Стимуляция клеток хрящевой ткани с помощью ФНО-α (10 нг/мл) приводит к высвобождению m-кальпаина в межклеточную среду, что сопровождается увеличением активности внутриклеточного m-кальпаина, эффект подавляется нестероидными противовоспалительными препаратами [95] (15501405). Кроме этого, на клетках предшественниках остеобластов мыши линии MC3T3-E1 было показано наличие m-кальпаина в культуральной среде, причем его высвобождение не блокировалось добавлением брефельдина А и моненсина, что указывает на неклассический путь секреции m-кальпаина из клетки. Однако эти же авторы отмечают, что высвобождение m-кальпаина было нехарактерно для клеток HeLa [96] (11453670). В работе Perez с коллегами [97] (26608921) удалось показать, что ядерные клетки крови человека и лимфоциты, выделенные из селезенки мыши, секретируют кальпаин по АВСА1-зависимому пути в составе микровизикул, которые во внеклеточной среде быстро разрушаются и высвобождают свое содержимое. Их гипотеза строится на том, что добавление в культуральную среду 100 мкМ глибурида (ингибитор ABCA1-транспортера) препятствовало секреции кальпаинов (µ- и m-кальпаина).

Существует ряд работ, в которых показано, что кальпаины присутствуют во внеклеточном пространстве, в частности, в различных биологических жидкостях человека (сыворотка крови, ликвор, синовиальная жидкость). Этот факт объясняли пассивным высвобождением кальпаина из поврежденных клеток. Например, кальпаин находили в синовиальной жидкости пациентов c ревматоидным артритом или остеоартритом, но не в синовиальной жидкости здоровых волонтеров [98] (2547364); в сыворотке крови пациентов с нарушениями свертываемости крови [99] (1471149), в ликворе пациентов с болезнью Альцгеймера [100] (25200336). Причем уровень m-кальпаина в ликворе этих пациентов был в среднем в 2,5 раза выше (по сравнению с контрольной группой), и увеличивался по мере снижения их когнитивных способностей. Наличие около 100 пМ/л m-кальпаина в СМЖ относительно здоровых доноров свидетельствует о том, что нельзя отрицать возможность высвобождения/секрециии кальпаинов некоторыми клетками.

Вероятно, в физиологических условиях кальпаины локализуются исключительно внутриклеточно в свободной и/или мембрансвязанной форме; при развитии определенных форм патологии некоторые клетки приобретают способность секретировать или высвобождать кальпаин, тем самым спектр доступных кальпаинам субстратов расширяется, а значит расширяется и спектр их функций.

**1.6. Физиологические функции кальпаинов**

Кальпаины расщепляют белки-субстраты по ограниченному числу сайтов с образованием крупных фрагментов, что приводит к модификации специфической активности последних. В связи с этим, основной функцией кальпаинов является регуляторная и/или сигнальная функция. Вероятно, кальпаины могут также выполнять функции, не связанные с их протеолитической активностью, но данный вопрос в литературе не обсуждается.

Способность кальпаина расщеплять большое количество белков адгезионных комплексов (талин, эзрин, паксиллин, винкулин, α-актинин, FAK-киназа, интегрины β1, β3 и β4) (для обзора [5] Goll et al., 2003) послужила предпосылкой для исследования кальпаина как фермента, регулирующего **клеточную подвижность**, поскольку расщепление белков адгезионных комплексов необходимо для открепления клетки от субстрата и образования новых фокальных контактов в области формирования и удлинения ламеллоподий. Практически все исследования роли кальпаиновой системы в регуляции клеточной подвижности были проведены на клеточных культурах с использованием синтетических ингибиторов кальпаина и показали, что подавление протеолитической активности кальпаина приводит к снижению миграционной способности клетки. Например, клетки яичников китайского хомячка линии CHO KI в присутствии ингибитора кальпаина I или II в диапазоне концентраций от 2,6 мкM до 260 мкM практически полностью утрачивали способность к бета1- и бета3-интегрин-опосредованной миграции за счет стабилизации фокальных комплексов адгезии [101] (9407041). Позже на этих же клетках было показано, что кальпаин расщепляет бета3-интегрин по остатку Tyr759, что является сигналом перехода клетки от состояния распластывания к ретракции по RhoA-зависимому пути; экспрессия в CHO клетках модифицированного устойчивого к расщеплению кальпаином бета3-интегрина вызывает усиление распластывания клеток по подложке [102] (17967945).

Кальпаины также вовлекаются в процесс регуляции клеточной подвижности через расщепление спектрина. Dourdin с коллегами (2001) от мышей с нокаутом гена малой субъединицы μ-кальпаина получили фибробласты, в которых спектрин и талин не подвергались расщеплению кальпаинами. Для этих клеток была характерна замедленная ретракция мембранных выступов, снижены адгезивные свойства, нарушена архитектура цитоскелета [103] (11602605). Схожий результат был получен на клетках крови человека. Например, введение в очищенные тромбоциты человека синтетического пептида, соответствующего В-субдомену кальпастатина, подавляло кальпаин-опосредованное расщепление талина и, как следствие, тормозило тромбин-индуцированную секрецию тромбоцитами альфа гранул, их агрегацию и распластывание по стеклу. Этот эффект наблюдался и при добавлении к тромбоцитам синтетических ингибиторов кальпаина: кальпептина, MDL 28,170 (MDL) и E64d [104] (10593923). Кроме этого, было показано, что механизм активации тромбоцитарных кальпаинов зависит от типа стимула. Добавление тромбина вызывает активацию кальпаинов непосредственно, а при применении фактора Виллебранда активация кальпаинов происходит только после Са2+-индуцированных конформационных изменений гликопротеина IIb/IIIa (αIIbβ3интегрин) (для обзора [105] 20933204), что указывает на вовлечение кальпаинов в реализацию нескольких сигнальных путей.

В экспериментах на культуре гладкомышечных клеток показано, что введение синтетического ингибитора кальпаинов предотвращает расщепление киназы фокальных контактов, талина и паксиллина, индуцированное фрагментами коллагена [106] (10545505). Схожие результаты были получены и на клетках HEK 293 [107] (31416818). Добавление ингибитора кальпаина I и II к первичной культуре дендритных клеток селезенки мыши усиливает образование нитей актина, способствует накоплению бета2-интегрина, талина, паксиллина и винкулина, а также белка синдрома Вискотта-Олдрича в подосомах, способствуя их стабилизации, и, как следствие, уменьшению скорости клеточной миграции. В отсутствии ингибиторов кальпаин расщепляет компоненты подосом, активируя миграционную способность дендритных клеток [108] (16723743).

Обработка бета клеток поджелудочной железы крысы ингибитором кальпаина I или калпептином приводит к снижению их способности распластываться по подложке, но не влияет на прикрепление к субстрату [109] (15784646).

Особый интерес вызывает вовлечение кальпаинов в регуляцию формирования нейронных сетей, что требует высокоточной навигации аксонов и дендритов, осуществляющейся с помощью подвижных структур, называемых ростовыми конусами или конусами роста. Одним из сигналов, контролирующих навигацию конусов роста, является локальное увеличение концентрации ионов Са2+, вызывающее гиперактивацию кальпаинов, критическим образом сказывающуюся на морфологии конусов роста [110] (12765611). Например, на первичной культуре клеток спинного мозга лягушки показали, что вход кальция в клетку через механочувствительные неспецифические ионные каналы TRPC1 вызывает активацию кальпаинов, которые, расщепляя талин, локализованный в области филоподий, нарушают их архитектуру и подавляют Srs-зависимое удлинение конусов роста аксона. Этот эффект отменялся добавлением 10 мкМ ингибитора кальпаина II [111] (23283340). Однако какие именно изоформы кальпаинов вовлечены в этот процесс долгое время оставалось неясным. В 2017 г. в удлиняющихся конусах роста нейронов спинного мозга лягушки был обнаружен и µ-, и m-кальпаин, а также продукты протеолитического расщепления талина и киназы фокальных контактов (FAK). Для выявления дифференциального вклада кальпаин-опосредованного протеолитического расщепления этих белков в регуляцию навигации конусов роста были сконструированы устойчивые к протеолизу кальпаинами молекулы: талин (L432G) и киназа фокальных контактов (V744G). Оказалось, что экспрессия талина L432G на 24% увеличивала число фокальных контактов, а экспрессия FAK V744G на 30% увеличивала частоту образования контактов и на 40% снижала длительность их существования [112] (28069919).

Кальпаины также вовлечены в процесс регуляции трансэндотелиальной миграции лимфоцитов. Например, активация форболовым эфиром Т-клеток, выделенных из крови человека, приводит к транслокации кальпаина из цитозоля к клеточной мембране. Там кальпаин накапливается в точках фокальной адгезии, активируется, расщепляет тирозин фосфатазу 1В, что вызывает изменение морфологии клетки и увеличивает ее подвижность [113] (11082296). Также кальпаины регулируют процесс миграции Т-клеток в ЦНС. Например, на модели экспериментального аллергического энцефаломиелита у крыс был показан терапевтический эффект введения ингибиторов кальпаина [114] (24707444), в частности, за счет снижения количества инфильтратов в ЦНС. На клетках Jurkat E6-1 (Т-клетки) удалось продемонстрировать усиление хемотаксиса в ответ на хемокин ССL2 путем добавления во внеклеточную среду ионов Са2+ и, как следствие, активации кальпаинов; этот эффект снимается аппликацией ингибитора кальпаина – кальпептина [115] (18831007). Данные более поздних исследований показали, что активация кальпаинов необходима не только для миграции активированных Т-клеток, но и непосредственно для их активации. Обработка наивных Т-клеток ингибитором кальпаина II в дальнейшем снижала способность лимфоцитов секретировать цитокины и экспрессировать транскрипционный фактор NFĸB [116] (27835610).

Кальпаины способны подавлять образование мембранных выростов у нейтрофилов. Например, в неподвижных нейтрофилах повышена продукция и активность μ-кальпаина; ингибирование активности μ-кальпаина приводит к поляризации нейтрофилов, образованию мембранных выпячиваний и стимулирует «хаотичную» миграцию, снижая способность нейтрофилов к миграции по градиенту хемоаттрактанта [117] (12649322). В нейтрофилах экспрессируется и m-кальпаин, причем в покоящихся клетках оба кальпаина распределены диффузно, а обработка клеток хемоаттрактантом приводит к их ассиметричному распределению: μ-кальпаин остается диффузно распределен в цитоплазме клетки, а m-кальпаин накапливается у переднего края клетки среди нитей F-актина вблизи рафтов. Наличие активированного m-кальпаина в этой области является необходимым для направленной миграции нейтрофилов по градиенту хемоаттрактанта [118] (17192410). Нейтрофилы, полученные от нокаутных по µ-кальпаину мышей, были меньшего размера, обладали сниженной способностью к распластыванию и к миграции через активированный ФНО-α эндотелиальный монослой [119] (30409431). Таким образом, присутствие µ- и m-кальпаина в нейтрофилах необходимо не только для их прохождения через эндотелий в ткани, но и для их адгезии к участкам эндотелия.

Кальпаины регулируют подвижность фибробластов. Например, Potter с коллегами на культуре NIH-3T3 фибробластов с повышенной продукцией кальпастатина показали, что такие клетки не способны удлинять ламеллоподии и имеют дефектные филоподии [120] (9566966). Оказалось, что этот эффект, по крайней мере частично, опосредован способностью кальпаинов расщеплять актин-связывающий белок кортактин [121] (16280362). Есть единичные данные о том, что скорость миграции и количество фокальных точек адгезии у фибробластов, полученных от *Capn4-/-* мышей, было значительно меньше по сравнению с *Capn4+/+* клетками, причем этот эффект не был связан с протеолитической активностью кальпаинов [122] (18840650).

Таким образом, и μ-, и m-кальпаин участвуют в регуляции архитектуры цитоскелета различных типов клеток (нейронов, Т-клеток, фибробластов, нейтрофилов и пр.), что сказывается на клеточной подвижности; аппликация ингибиторов кальпаина или генетические модификации, препятствующие протеолитическому расщеплению кальпаинами их субстратов, как правило, вызывают снижение миргационной способности клеток.

В ряде исследований на культуре клеток с использованием синтетических ингибиторов кальпаина показано вовлечение кальпаинов в регуляцию **клеточного цикла**. Первые работы в этой области появились в начале 1990-х годов ХХ века, когда было обнаружено изменение локализации кальпаина и кальпастатина во время пролиферации клеток карциномы человека А431. Оказалось, что в интерфазной клетке кальпастатин визуализируется непосредственно вокруг ядра, а обе формы кальпаина распределены диффузно по всей цитоплазме. Во время митотического деления m-кальпаин концентрируется у веретена деления в области центромеры, а μ-кальпаин накапливается у клеточной мембраны вблизи основания веретена деления [123] (1426051). В дальнейшем исследования проводились на СНО клетках, которые инкубировали в среде с ингибитором кальпаинов (ZLLY-CHN2). Часть клеток обладала пониженной чувствительностью к данному ингибитору, поскольку содержала меньшее количество μ-кальпаина при неизменном содержании и активности m-кальпаина и кальпастатина. Количество таких клеток удваивалось за 29 часов, в то время как «нормальным» СНО клеткам требуется всего 19 часов; снижение скорости роста этих клеток, как оказалось, было вызвано удлинением G1 фазы [124] (8663205). Следовательно, для прохождения через G1 фазу клеткам СНО необходим μ-кальпаин. В подтверждение этой гипотезы был проведен следующий эксперимент. К культуре клеток фибробластов человека линии WI-38 добавляли этот же ингибитор (ZLLY-CHN2) и он полностью блокировал пролиферацию фибробластов в поздней G1 фазе; это приводило к двукратному увеличению содержания общего белка без изменения содержания мРНК р53 (полифункциональный белок, основная функция которого состоит в негативной регуляции клеточного цикла), который является субстратом кальпаина. Авторы этого исследования предположили, что протеолитическое расщепление белка р53 кальпаином является необходимым для перехода от G1 к S фазе клеточного цикла, поэтому блокирование протеолиза р53 в этой клеточной системе приводит к остановке клеточного цикла в G1 фазе [125] (9018111). Кроме белка р53 прохождению клетки через G1 фазу митоза способствует циклин D1, который, как полагают, также является субстратом кальпаина. Ниже перечисленны экспериментальные данные, подтверждающие этот тезис. Быстрая потеря циклина D1 при сывороточном голодании клеток линии NIH3T3 подавляется действием синтетических ингибиторов кальпаина и повышенной продукцией кальпастатина [126] (9353308); повышенная продукция кальпастатина замедляет прохождение эмбриональных фибробластов цыпленка через фазу G1 [127] (11739739); молекула циклина D1 содержит PEST области, характерные для субстратов кальпаина [128] (9342364). Позже было обнаружено, что субстратами кальпаина является белок р21, а также ингибитор циклин-зависимой киназы р19 [129] (16542156). Совокупность данных позволяет предположить, что кальпаин принимает участие в регуляции клеточного цикла, модулируя активность не только белка р53, циклина D1, а также белков р21 и р19.

В последних исследованиях появляется все больше информации о том, что кальпаины регулируют клеточный цикл в большем количестве точек. Например, добавление ингибитора кальпаина PD 150606 к клеткам линии TF-1 (получены от пациента с эритролейкозом) нарушало переход G2/M, а также препятствовало прохождению клеток через S-фазу [130] (15041468). Однако есть работы, напротив, свидетельствующие в пользу того, что для прохождения клеток через S-фазу необходим m-кальпаин. Например, к клеткам линии U-2 OS (остеосаркома человека) добавляли водный экстракт *Rheum palmatum* (ревень пальчатый). Это приводило к усилению продукции Bax, Bak, Bad, cyclin B, AIF, p21, p27 и m-кальпаина и вызывало замедление прохождения клеточного цикла через S-фазу [131] (25689151). Вероятно, в данном случае m-кальпаин является одним из индукторов апоптоза, а регуляторная роль принадлежит µ-кальпаину или другим изоформам данного семейства.

На клетках немелкоклеточного рака легкого человека, по сравнению с клетками эпителия бронхов, показано 2-х кратное увеличение уровня мРНК и белка m-кальпаина, что приводит к интенсификации пролиферации этих клеток через активацию EGFR-pAKT сигнального пути [132] (30662353). Схожие данные получены на клетках рака предстательной железы (DU145 и PC3): содержание мРНК m-кальпаина в них было повышено, а выключение экспрессии CAPN2 ингибировало пролиферацию этих клеток путем остановки клеточного цикла в фазе G1, подавляло их способность к миграции и инвазии за счет снижения активации матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2) и MMP-9, а также за счет подавления экспрессии и фосфорилирования AKT /mTOR [133] (28280729).

Кальпаины также являются «регуляторами» мейоза. Представители кальпаиновой системы обнаруживаются в яйцеклетках и сперматозоидах млекопитающих [134, 135] (16049154; 15950654); экспрессия μ- и m-кальпаина наблюдается на всех стадиях сперматогенеза, но при переходе к мейозу повышается только экспрессия μ-кальпаина [136] (15798018). С помощью методов иммуногистохимии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии была показана локализация изоформы кальпастатина с молекулярной массой 110 кДа непосредственно у мембраны и, в особенности, в области мейотического веретена деления яйцеклетки мейоза I и мейоза II. Изоформа кальпастатина с молекулярной массой 77 кДа оказалась локализованной вблизи поверхностного слоя ооплазмы с кортикальными гранулами. Активация яйцеклетки вызывала перемещение «мембранного» кальпастатина с молекулярной массой 110 кДа в кортикальный слой, а кортикальный m-кальпаин, напротив, смещался к мембране [137] (16388007). Вероятнее всего, в регуляцию мейоза вовлекается μ-кальпаин, а m-кальпаин является участником процесса активации яйцеклетки при оплодотворении. Таким образом, несмотря на отсутствие данных о субстратной специфичности по отношению к μ- или m-кальпаину, данные изоформы кальпаинов в одних и тех же клетках могут выполнять различные и даже противоположные функции.

Кальпаиновая система вовлечена в процессы **клеточной дифференцировки**, причем в зависимости от направления дифференцировки имеет место разнонаправленное изменение продукции m- и μ-кальпаина. Например, созревание мегакариоцитов сопровождается снижением содержания m-кальпаина и повышением μ-кальпаина [138] (1519233); дифференцировка клеток К562 в направлении макрофагов - повышением уровня обеих протеаз [8] (1618329). Обработка РС12 клеток ФРН, приводящая к образованию и удлинению нейритов, вызывает снижение активности обеих протеаз примерно в два раза, при этом аппликация калпептина отменяет этот эффект [139] (8041520). Процесс дифференцировки L8 миобластов сопряжен с повышением синтеза обоих кальпаинов, а подавление синтеза μ- и m-кальпаинов вызывает торможение формирования мышечных волокон [140] (16387524).

Дифференцировка фибробластов в миофибробласты также осуществляется при участии компонентов кальпаиновой системы. Так, на модели осложненного раневого процесса у мышей показано отсутствие кальпастатина во вновь образованных подкожных капиллярах, при этом у животных с генетически детерминированным повышением содержания кальпастатина раны заживали значительно медленнее, в частности, за счет снижения активности m-кальпаина, подавления продукции тромбоцитарного ростового фактора и его бета рецептора [141] (30199285).

Особый интерес представляет исследование, посвященное изучению вклада кальпаинов в регуляцию Wnt сигнального пути, обеспечивающего дифференцировку нейральных стволовых клеток. Ранее уже была показана необходимость активации кальпаинов для активации циклинзависимой киназы 5-го типа (CDK5). Именно активированный m-кальпаин (но не µ-кальпаин) обеспечивает расщепление белка р35 до р25, который перемещается от периферии клетки к ядру и/или к околоядерным областям, приводя к образованию p25/Cdk5 и активации киназы [142] (28559121). В исследовании Shu с коллегами (2018) на клетках нейробластомы SH-SY5Y продемонстрировали, что белок семейства Wnt - Wnt-5a повышает продукцию p25 через активацию m-кальпаина и вызывает активацию Cdk5 при нейрональной дифференцировке SH-SY5Y клеток. Подавление активности Wnt-5a с помощью специфических антител или подавление продукции данного белка с помощью малых интерферирующих РНК отменяет индуцированную BDNF дифференцировку SH-SY5Y клеток [143] (30562750). Таким образом, кальпаины вовлекаются в регуляцию клеточной дифференцировки через модуляцию процесса **внутриклеточной сигнализации**. Кальпаины вовлечены в регуляцию активности не только Cdk5 киназы. Например, субстратом кальпаинов является ПКС, причем продукт ее расщепления также обладает киназной активностью, но является специфичным для другого спектра субстратов. В дофаминергических нейронах, в ответ на вход кальция в клетку через VGCCs каналы (voltage-gate calcium channels), m-кальпаин активируется и расщепляет ПКС. Это приводит к разобщению каталитической и регуляторной субъединиц ПКС и образованию короткоживущей конститутивно активной протеинкиназы М (ПКМ). ПКМ, в свою очередь, регулирует функциональное состояние дофаминергической системы, фосфорилируя DAT (транспортер дофамина) и D2 [144] (17237234).

Src киназа и фосфатаза PTP-1B, регулирующие чувствительность рецептора к инсулину, а также участвующие в процессах эмбрионального развития и клеточного роста, тоже расщепляются кальпаинами [145, 146] (7685344; 27872190). Расщепление кальпаином β-интегрина приводит к утрате его способности взаимодействовать с талином, филамином, L-пластином, модулируя процесс перестройки цитоскелета клетки [147] (20183869). В свою очередь, расщепление филамина А кальпаином приводит к образованию пептида с молекулярной массой 90 кДа, который способствует накоплению HIF-1α в ядре клетки и таким образом индуцирует экспрессию HIF-зависимых генов [148, 149] (29599325; 24550283).

В нескольких исследованиях показана способность µ-кальпаина расщеплять белки семейства малых ГТФаз Rac (Rat sarcoma), вовлеченных в регуляцию цитоархитектуры клетки [150, 151] (11964413; 25653381). Например, на срезах гиппокампа крысы было выявлено, что аппликация BDNF приводит к перестройке актинового цитоскелета. В первые пять минут после добавления BDNF наблюдается увеличение степени полимеризации актина, с восстановлением исходного состояния к 15-й минуте; к 30-й минуте после добавления ростового фактора степень полимеризации актина опять увеличивается; повторное восстановление состояния наблюдается через 60 минут после воздействия. Содержание RhoA (Ras homology) под действием BDNF изменялось аналогичным образом. Оказалось, что BDNF стимулирует синтез RhoA de novo через mTOR-зависимый (mammalian target of rapamycin) сигнальный путь, при этом обработка срезов ингибитором кальпаинов PD151746, преимущественно подавляющим активность µ-кальпаина, не отражалась на BDNF-индуцированном повышении продукции RhoA, а добавление специфического (относительно!) ингибитора m-кальпаина – блокировало эффект. Авторы данного исследования [151] (25653381) предложили следующую гипотетическую схему влияния кальпаинов на BDNF-индуцированную продукцию RhoA. Аппликация BDNF вызывает активацию m-кальпаина, который, в свою очередь, по еще неизвестному механизму «стимулирует» фосфорилирование протеинкиназы mTOR, переводя ее в активированное состояние [133] (28280729). mTOR интенсифицирует биосинтез белка, в том числе RhoA, за счёт фосфорилирования ключевых регуляторов трансляции мРНК; повышение содержания в клетке RhoA через активацию ROCK вызывает полимеризацию актина. RhoA, являясь субстратом µ-кальпаина, подвергается протеолитическому расщеплению с утратой своих функций – актин деполимеризуется [151] (25653381). Таким образом, архитектура цитоскелета клетки зависит от отношения активности µ- и m-кальпаина.

Кальпаины также вовлечены в регуляцию **апоптоза**. Например, на клеточных линиях MCF-7, HeLa, и SH-SY5Y показано, что протеолитическое расщепление проапоптотических каспаз-7 и -9 кальпаином приводит к их инактивации и предотвращает апоптоз [152] (10671558), при этом m-кальпаин в клетках ЦНС способен расщеплять прокаспазу-3 и -12 с образованием проапоптотических каспаз и, таким образом, способствует апоптозу [153] (11124942; для обзора [154] 29693408). Каспазы же могут расщеплять кальпастатин, вызывая дополнительную активацию кальпаинов, и интенсифицировать процесс апоптотической гибели клетки [155, 156] (9705209; 16776917). Таким образом, каспазы и кальпаины могут работать либо согласованно, либо независимо, а иногда и в противоположных «направлениях» в зависимости от типа клетки или от природы проапоптотического сигнала.

Субстратами кальпаина также являются другие белки-регуляторы апоптоза: р53, Bax, Bcl-xL, Bid, Bak, NFκB [157, 158] (25305531; 21887410). Например, кальпаины расщепляют белок Bax с образованием фрагмента 18 кДа (Bax/p18), который является мощным проапоптотическим агентом. Более того, в отличие от полноразмерного Bax, Bax/p18 теряет способность взаимодействовать с антиапоптотическими белками Bcl-2 и/или Bcl-xL [159] (12816867). Кальпаин расщепляет Bid между Gly70 и Arg71 (для аминокислотной последовательности человека) с образованием активной молекулы, индуцирующей высвобождение цитохрома с изолированными митохондриями; обработка клеток метастазирующей меланомы человека 224 или клеток карциномы легкого а549 цисплатином вызывает подавляемую калпептином активацию проапоптотического пути с образованием аналогичного продукта протеолиза Bid [160, 161] (11940658; 18214855), что указывает на возможное вовлечение кальпаинов в реализацию (усиление) индуцируемого цисплатином апоптоза. Проапоптотическое действие кальпаинов также объясняют его способностью расщеплять X-связанный ингибитор белка апоптоза (XIAP). Предполагается следующая цепь событий: в результате действия проапоптотического фактора активируются кальпаины, в частности, µ-кальпаин, который расщепляет XIAP; расщепление XIAP приводит к активации проапоптотических каспаз, клетка погибает [162] (17514421). Данная гипотеза нашла подтверждение в более поздних исследованиях. Huang с коллегами (2017) показали, что снижение активности кальпаина в U937 клетках способствует их устойчивости к апоптозу за счет увеличения содержания полноразмерной молекулы XIAP1 и другого ингибитора апоптоза – сурвивина [163] (28881589).

Многочисленные исследования показывают, что кальпаины способны, расщепляя белок р53 (например, с образованием фрагмента 26 кДа), модифицировать его функции и таким образом модулировать апоптотический потенциал клетки [164] (17130844). Например, флавоноид рутин (витамин Р) предотвращал индуцированную четыреххлористым углеродом гибель клеток почек у мышей. Оказалось, что этот эффект опосредуется через подавление активности кальпаинов и, как следствие, через снижение содержания продуктов протеолитического расщепления белка р53 при одновременном угнетении его продукции [165] (29522708). Однако в работе Atencio с коллегами (2000) на различных клеточных линиях опухолей человека оценивали способность ингибитора кальпаина I усиливать р53-зависимый апоптоз и оказалось, что обработка ингибитором кальпаина 1 приводит к повышению уровня активированного р53, увеличению содержания белка р21, активации каспаз, гибели клеток путем апоптоза [166] (10845425). Проапоптотический эффект ингибиторов кальпаина был обнаружен еще рядом авторов. Например, сверхэкспрессия кальпастатина в клетках нейробластомы человека линии SH-SY5Y вызывала увеличение активности каспазы-3 и, тем самым, стимулировала апоптоз [167] (12576481). Можно предположить, что направленность действия кальпаинов зависит от типа клеток, однако исследование CHO клеток со сверхэкспрессией кальпастатина показало, что повышенный уровень кальпастатина предотвращает апоптоз, индуцированный тапсигаргином, сывороточным голоданием или Са2+ ионофором А23187, в то время как сверхэкспрессия μ-кальпаина в этих же клетках также защищает их от апоптотической гибели, индуцированной ФНО-α (обобщено в [168] 12063165). Таким образом, участие кальпаинов в регуляции апоптоза определяется типом клетки и природой апоптотического стимула.

Особого рассмотрения требует участие кальпаинов в регуляции выживаемости/гибели нейронов (для обзора [169, 170] 30819083; 29623944). На сегодняшний день уже общепризнано, что нейроны, как и большинство других клеток, могут «погибать» тремя путями: путем апоптоза (под действием внешних или внутренних факторов), путем аутофагии, путем некроза (регулируемого или нерегулируемого) [171] (28747251). Кальпаины вовлечены в регуляцию всех вышеперечисленных путей. Например, для клеток нервной системы показано, что активация каспазы 12 является кальпаин-зависимым процессом [172] (24287800). Аппликация ионофорного полиэфирного антибиотика салиномицина к нейронам спинномозговых узлов мыши вызывала активацию µ- и m-кальпаина, индуцируемое ими расщепление и активацию каспазы-3, -9 и -12, и, как следствие, вызывало гибель клеток путем апоптоза [173] (21633391). Yamada с коллегами (2012) выявили, что подавление экспрессии гена *capn1* в нейронах приводит к снижению активности каспазы-3, увеличению активности XIAP (ингибитор каспазы-3) и подавлению апоптоза [174] (22367208). Как уже было сказано выше, кальпаины могут опосредовать не только про-, но и противоапоптотические сигналы, и в этом отношении клетки нервной системы не являются исключением. Например, в клетках нейробластомы SH-SY5Y активированный m-кальпаин расщепляет каспазу-9, лишая ее способности активировать каспазу-3, блокируя митохондриальный путь апоптоза [175] (23111339). AIF (apoptosis-inducing factor) - фактор инициации апоптоза, также является субстратом кальпаинов. Его укороченная форма (tAIF) образуется на внутренней мембране митохондрий и, проникая в цитоплазму, способствует активации каспазы-9, конденсации хроматина и фрагментации ДНК [176] (24211851). Yamada с коллегами (2012) сообщает, что гибель нейронов путем апоптоза, вызванного ишемией, сопровождается перемещением AIF из митохондрий в цитоплазму, и этот процесс блокируется подавлением экспрессии гена *capn1* [174] (22367208). Еще одна мишень кальпаина, вовлекаемая в AIF-индуцируемый апоптоз нейронов, - белок теплового шока 70 (БТШ70). БТШ70 связывается с AIF и поддерживает его стабильность для предотвращения апоптоза, однако µ-кальпаин разрушает БТШ70, инициируя транспорт AIF из митохондрий в цитоплазму [177] (15744251).

Как уже было сказано выше, кальпаины участвуют в модуляции активности Cdk5. Для активации данной киназы необходимо ее взаимодействие с белком р35, однако кальпаины могут расщеплять его с образованием р25 или р10. P25 активирует Cdk5, образуя комплекс Cdk5-p25, который инактивирует белок MEF (myocyte enhancer factor), важнейший для выживаемости дофаминергических нейронов фактор [178] (27542341). Кроме этого, комплекс Cdk5-p25 способен усиливать продукцию белка р53, способствуя активации каспазы-3 [179] (17977053). Еще один эффект от образования данного комплекса - фосфорилирование NR2A субъединицы NMDAR глутамата, приводящее к повышенной продукции функциональных NMDAR, перегрузке клетки кальцием, дополнительной активации кальпаинов и, в итоге, к гибели клеток ЦНС [180] (22870316).

В клетках нервной системы кальпаины также вовлекаются в процесс регуляции аутофагии [170, 181] (25257175; 29623944). Белок атаксин-3, мутация в гене которого связана с развитием болезни Мачадо-Джозефа (генетически обусловленная спиноцеребеллярная атаксия, клинически представленная полиморфными сочетаниями мозжечкового синдрома с проявлениями вторичного паркинсонизма, гиперкинезами, пирамидными расстройствами в виде спастических параличей и офтальмоплегии, амиотрофиями), расщепляется µ- и m-кальпаинами в двух сайтах с образованием токсических фрагментов, вызывающих индукцию аутофагии [182] (28334907). Однако при ишемическом повреждении клеток сетчатки кальпаины могут ингибировать аутофагию, расщепляя белок беклин-1 [183] (21490676). Кальпаины также расщепляют белок LAMP2 (lysosomal membrane permeabilization protein 2), вызывая пермеабилизацию лизосомальной мембраны и подавление аутофагии [184] (28661473). В серии исследований показано участие кальпаинов в переключении процесса аутофагии на апоптоз. Например, в нейрональных стволовых клетках гиппокампа (NSC) крысы содержание m-кальпаина было примерно таким же как в клетках HEK293 (не нейронального происхождения) и клетках SH‐SY5Y (нейронального происхождения); µ-кальпаин в NSC клетках, в отличии от клеток сравнения, не выявлялся. При инкубации этих клеток в безынсулиновой среде наблюдались следующие изменения: уровень мРНК m-кальпаина повышался, а белка – падал; содержание мРНК и белка µ-кальпаина, как и при инкубации клеток в присутствии инсулина, было крайне низким. Подавление продукции m-кальпаина или его ингибирование приводило к увеличению доли клеток, погибающих путем аутофагии, при этом сверхэкспрессия µ-кальпаина приводила к увеличению доли клеток, погибающих путем апоптоза [185] (26086870). Кроме этого, в исследовании Machado VM с коллегами (2015) подавление экспрессии кальпастатина в NSC клетках нарушало их пролиферацию и снижало миграционную способность нейробластов, при этом аппликация кальпептина вызывала противоположный эффект, стимулируя нейрогенез в субвентрикулярной зоне гиппокампа [186] (25698931). Таким образом, на HCN клетках показано, что в ответ на один и тот же стимул активация µ-/m -кальпаина приводит к различным последствиям.

Кальпаины также вовлечены в регуляцию партанатоса нервных клеток (форма программируемой гибели клеток из-за накопления в клетке поли (АДФ-рибоза)-полимеразы (PAPR)). При повреждении ДНК PARP активируется и транслоцируется из ядра к митохондриальной мембране, где по неизвестному механизму облегчает активацию µ-кальпаина, который расщепляет AIF до tAIF, способствуя перемещению последнего в ядро [187] (20697198). Аналогичная цепь событий была показана для N-ацетилсфингозин (C2-церамид)-индуцированной гибели путем партанатоса первичной культуры клеток нейронов сетчатки [188] (30387075). Любопытно, что PARP является субстратом кальпаинов, а активация PARP требует активации кальпаинов [189] (26950517). Следовательно, PARP-1 и µ-кальпаин действуют сонаправленно, вызывая AIF-опосредованный некроз.

Некроптоз, RIP (receptor-interacting protein)-опосредованная запрограммированная форма некроза, также регулируется кальпаином. Например, белок JIP1 (JNK interacting protein 1) является субстратом кальпаинов. Его деградация под действием кальпаинов в PC12 клетках, обработанных вальпроевой кислотой, приводит к активации JNK-1 (c-Jun N-terminal kinases), которая стимулирует продукцию RIP-1. RIP-1 связывается с белком RIP-3, они фосфорилируют друг друга и собираются в структуры, называемые «некросомы» [190] (25581256). Однако, с одной стороны, JNK (а значит и кальпаин) участвует в запуске ФНО-α-индуцированной гибели клеток, а с другой - способствует выживанию клетки и подавляет апоптоз, индуцируемый ФНО-α. Таким образом, и в этом случае кальпаины участвуют в переключении некроптоза на апоптоз.

Кальпаины также вовлечены в процесс регуляции **синаптической пластичности и нейромедиаторного обмена**.Идентификация спектрина как субстрата кальпаина стала первым весомым аргументом в пользу предположения о вовлечении кальпаиновой системы в регуляцию долговременной потенциации (LTP – long-temp potentiation) синаптической передачи. Действительно, LTP проявляется в функциональной и морфологической реорганизации синаптических межнейрональных связей, которые невозможны без перестройки цитоскелета клетки. Подавление активности кальпаина с помощью специфических ингибиторов или же путем введения соответствующей миРНК приводит к предотвращению индукции LTP, а у мышей с нокаутом гена µ-кальпаина и вовсе нарушена гиппокамп-зависимая пространственная память [191, 192] (23536090; 16150618). Напротив, у мышей, дефицитных по кальпастатину, наблюдается усиление эффективности долговременной потенциации [193] (18803809). Дополнительным фактом в пользу гипотезы об участии кальпаинов в регуляции LTP послужило обнаружение способности кальпаина изменять эффективность связывания глутамата с его рецепторами [194] (7015504). Кроме этого, оказалось, что агонисты рецепторов глутамата могут активировать кальпаин. В частности, системное или интрацеребровентрикулярное введение агонистов рецепторов глутамата (кайнат, NMDA) индуцирует кальпаин-зависимое расщепление спектрина и МАР2 (microtubule-associated protein-2) [195] (2856162). Добавление NMDA к культуре гранулярных клеток мозжечка приводит к накоплению 150 кДа фрагмента αII-спектрина, причем данный эффект критическим образом зависит от концентрации Са2+ и подавляется ингибитором кальпаина I [196] (1848081). На переживающей культуре клеток гиппокампа показано, что аппликация NMDA вызывает активацию кальпаина, который, в свою очередь, расщепляет спектрин, причем данный эффект подавляется высокоаффинным ингибитором NMDA рецепторов глутамата МК-801 [197] (8177514). Таким образом, стимуляция рецепторов глутамата, вызванная аппликацией различных агонистов, приводит к активации кальпаина, расщеплению кальпаин-чувствительных белков цитоскелета, и, как следствие, к изменению цитоархитектуры клетки и структурно-функциональной реорганизации синапса.

Кальпаины вовлечены не только в регуляцию LTP, но и способны модулировать синаптическую передачу в целом, в частности за счет расщепления белков, входящих в состав рецепторов к нейромедиаторам. Например, все три подтипа NR2 (NR2A-C) субъединицы NMDA рецепторов глутамата являются субстратами кальпаина. Сайт расщепления находится в С-концевом домене молекулы, например, субъединицу NR2A кальпаин расщепляет между 1279 и 1330 аминокислотой. После протеолиза N-концевой фрагмент NR2 субъединицы остается в связанной с NR1 форме, и они формируют функционально-активный рецептор, который отличается от исходного по многим электрофизиологическим характеристикам [198] (15590920). По другим данным, сайт расщепления NR2A кальпаином находится вблизи 1051 аминокислоты, такой N-концевой фрагмент является нестабильным и не способен обеспечивать нормальное функционирование рецептора [199] (12183659).

Кальпаин также расщепляет GluR1 субъединицу АМРА рецепторов глутамата, причем преинкубация выделенных синаптических мембран с ингибитором фосфатаз препятствует протеолизу, но никак не сказывается на способности кальпаина расщеплять спектрин [200] (17234699). Это означает, что способность кальпаина расщеплять субъединицы рецепторов глутамата дополнительно регулируется соотношением в клетке активированных киназ/фосфатаз.

Субстратом кальпаина также является белок постсинаптических уплотнений PSD-95 (postsynaptic density protein of 95 kDa), связывание которого с NR2А субъединицей NMDA рецептора глутамата необходимо для заякоривания рецептора в мембране [201] (11309846). Причем совместная экспрессия PSD-95 и NR2A в эмбриональных клетках почек человека линии НЕК293 блокирует расщепление кальпаином субъединиц рецептора глутамата. Данный эффект не связан со снижением активности кальпаина, изменением уровня внутриклеточного кальция или нарушением процесса интернализации лиганд-рецепторного комплекса, но полностью снимается при введении делеции в C-концевом мотиве NR2A и при экспрессии мутантного белка PSD-95, который не способен образовывать кластеры и взаимодействовать с NMDA рецептором [198] (15590920). Таким образом, кластеризация белка PSD-95 и его прямое взаимодействие с NR2A предотвращают протеолитическое расщепление NR2A и NR2B кальпаином. Напротив, расщепление PSD-95 кальпаином препятствует его кластеризации и приводит к изменению субклеточной локализации NMDA рецептора и, следовательно, сказывается на синаптической активности.

Еще один субстрат кальпаина – белок GRIP (glutamate receptor-interacting protein). Поскольку GRIP является одним из белков, стабилизирующих синаптические окончания, его протеолиз под действием кальпаина приводит к структурной и функциональной реорганизации синапса, в частности, нарушает связь между GRIP и GluR2 субъединицей АМРА рецептора, ослабляя заякоривание рецептора в синаптической мембране [202] (11413238). Некоторые субъединицы метаботропных рецепторов глутамата также являются субстратами кальпаина. Например, С-концевой внутриклеточный домен mGluR1-α может быть расщеплен кальпаином, в результате чего становится невозможной активация PI3K-Akt сигнального пути, что лишает клетку способности к передаче сигналов на выживание [203] (17270736). Однако помимо повреждающего действия кальпаины через NMDAR могут оказывать и нейропротективный эффект. Например, расщепляя NR2A субъединицу, кальпаины могут «вывести из строя» NMDA-рецептор глутамата и, тем самым, предотвратить развитие эксайтотоксичности [199] (12183659). Также результатом активации синаптических NMDA рецепторов глутамата является гиперактивация µ-кальпаина, который, в свою очередь, расщепляет PHLPP1 фосфатазу (leucine-rich repeat Protein Phosphatase 1) и снимает блок с Akt- и ERK1/2-зависимых сигнальных путей, определяющих выживание клетки. Однако активация внесинаптических NMDA рецепторов приводит к активации m-кальпаина, расщеплению им STEP-фосфатазы (striatal-enriched protein tyrosine phosphatase) и, как следствие, к смерти нервной клетки [204] (24285894).

Двойственная роль кальпаинов в регуляции синаптической пластичности подтверждена еще в нескольких исследованиях [205, 206] (27188456; 26874794). Например, на срезах мозжечка, полученных от мышей с нокаутом гена µ-кальпаина, при низкочастотной стимуляции параллельных волокон показано нарушение синаптической передачи к клеткам Пуркинье, однако аппликация ингибитора m-кальпаина приводила к ее усилению вне зависимости от уровня экспрессии гена CAPN1 [207] (30735788). Можно заключить, что µ-кальпаин усиливает, а m-кальпаин подавляет синаптическую передачу. Этими примерами мы еще раз подтверждаем двойственную роль кальпаинов, причем не только в регуляции выживаемости/гибели нервных клеток, но и в модуляции синаптической передачи.

Помимо всего вышесказанного, кальпаин еще расщепляет синаптосомальный белок SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa), что приводит к нарушению экзоцитоза синаптических везикул и препятствует высвобождению нейромедиаторов [208] (15992386). Везикулярный транспортер ГАМК (VGAT) также является субстратом кальпаина. При расщеплении VGAT кальпаином образуется стабильный белковый фрагмент tVGAT, лишенный пятидесяти N-концевых аминокислот. Такой усеченный белок не способен «закачивать» ГАМК в синаптические везикулы, что приводит к нарушению или полному подавлению ГАМК-ергической трансмиссии [209] (21430162). Кроме этого, существуют данные о непосредственном участии кальпаинов в регуляции образования ГАМК: кальпаин может расщеплять глутаматдекарбоксилазу (GAD) — фермент, катализирующий преобразование глутамата в ГАМК посредством декарбоксилирования, - нарушая ее нормальное функционирование [210] (18599042). В 2005г. было показано, что субстратом кальпаина является белок синаптических окончаний – GAP-43 (growth associated protein) [211] (16212546), участие которого в регуляции освобождения нейромедиаторов было продемонстрировано в ряде работ [212] (28912688). Так, введение антител к этому белку в синаптосомы, пермеабилизированные стрептолизином-О, нарушает освобождение норадреналина, холецистокинина-8 и дофамина. Функционально-важным доменом белка GAP-43, стимулирующим нейросекрецию, является N-концевой участок, содержащий кальмодулин-связывающий домен и остаток серина-41. Именно этот домен и разрушается кальпаином, следовательно, присутствие в синаптических окончаниях активированного кальпаина может привести к нарушению норадреналинергической, дофаминергической и пептидергической передачи. Кроме этого, в дофаминергических нейронах в ответ на вход кальция в клетку через VGCCs каналы (voltage-gate calcium channels) кальпаин активируется и расщепляет ПКС. Это приводит к разобщению каталитической и регуляторной субъединиц ПКС и образованию короткоживущей конститутивно активной протеинкиназы М (ПКМ). ПКМ, в свою очередь, регулирует состояние дофаминергической системы, фосфорилируя DAT (транспортер дофамина) и D2 рецептор [144] (17237234). Кроме этого, сам DAT является субстратом кальпаина. Протеолитическое расщепление DAT кальпаином происходит между лейцином-71 и серином-72 (для DAT человека) и лишает транспортер активности [213] (18468730). Таким образом, кальпаин нарушает регуляцию обратного захвата нейромедиатора. Однако и дофамин сам по себе способен модулировать активность кальпаинов. Например, при инкубации переживающих срезов мозга крысы с 1нМ дофамина содержание автолизированного m-кальпаина увеличивается в два раза. Этот эффект подавляется: ингибитором кальпаина I, EGTA, антагонистом рецептора дофамина типа D1 [214] (8699533). Однако обработка эндотелиальных клеток человека 25 мкМ дофамина приводит к подавлению активности m- и µ-кальпаина, индуцированной холодовым стрессом. При этом преинкубация клеток с дофамином предотвращает еще и автолитическое расщепление µ-кальпаина. Сходный эффект наблюдается при добавлении в среду EDTA. Авторы полагают, что в этом случае дофамин выступает в роли хелатора ионов кальция и таким образом препятствует активации кальпаина [215] (19375722). Однако в многочисленных in vivo исследованиях показано, что только подавление чрезмерной активности кальпаинов с помощью синтетических ингибиторов предотвращает дегенерацию дофаминергических нейронов (для примера [216, 217] 30591714; 29772491).

Любопытно, что клетки линии N27 (дофаминергические нейроны), обработанные нейротоксином МРТР, высвобождают во внеклеточную жидкость µ-кальпаин. При добавлении µ-кальпаина в межклеточную жидкость смешанной глиально-нейрональной культуры происходит активация микроглии, развитие реактивного микроглиозиса, клетки микроглии начинают выделять в межклеточную жидкость активные формы кислорода и другие провоспалительные вещества, приводящие к повреждению нейронов [94] (20123724). Этот факт служит подтверждением гипотезы о способности кальпаинов высвобождаться/секретироваться во внеклеточную среду. Поскольку в условиях описанного выше эксперимента происходит активация микроглиальных клеток, нельзя исключить, что среди рецепторов на поверхности микроглиальных клеток есть субстраты кальпаина, или же, попадая в межклеточную среду, кальпаины приобретают новые, не связанные с протеолизом функции.

Таким образом, активация кальпаинов играет критическую роль в процессах синтеза некоторых нейромедиаторов, их упаковки в синаптические пузырьки, регуляции везикулярного транспорта, высвобождения нейромедиаторов, модуляции их рецепторов и процесса обратного захвата, а также в стабилизации/дестабилизации структуры синапса. При этом повышенная активация µ- или m-кальпаина может приводить как к гибели нервной клетки, так и к ее выживанию; кальпаины даже способны активировать нейрогенез во взрослом мозге.

**2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**2.1 Материалы**

Все реагенты для приготовления буферных растворов были приобретены в АО «ВЕКТОН» или Sigma Aldrich (США). Все общелабораторные реактивы (акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, глицин, трис, сахароза, HEPES и пр.) приобретались в VWR Life Science AMRESCO (США). В работе использовались антитела производства Abcam (UK): № ab28258, ab39165, ab28253, ab112, ab 34731; нитроцеллюлозная мембрана ReliaDisc Membrane Filters, Ahlstrom (Германия); система детекции ECL - ab133409 Optiblot ECL Ultra Detect Kit.

В работе использовали 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (Sigma Aldrich, США, № М103); MnCl2 (Sigma Aldrich, США, № 450995); 3-нитропропионовая кислота (Sigma Aldrich, США, № N5636); липополисахарид (Sigma Aldrich, США, № L2880).

**2.2 Лабораторные животные**

Все описываемые в работе исследования проводились на самцах крыс Вистар, всего 250 особей. Такое количество животных достаточно для полной регистрации исследуемых эффектов и статистической обработки полученных данных. Крысы поступали из питомника Федерального государственного унитарного предприятия «Питомник лабораторных животных «РАППОЛОВО», Ленинградская область. На момент начала эксперимента возраст животных составил 12 недель, а вес – 250 - 280 г. Все запланированные в исследовании процедуры с животными рассмотрены Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ», который пришел к заключению, что планируемое исследование соответствует принципам гуманного обращения с животными; количество запрашиваемых животных соответствует планируемым исследованиям; имеющаяся материальная база соответствует планируемым исследованиям, и запланированные манипуляции, согласно классификации, предложенной в директиве 2010/63/EU, относятся к категории легкой степени тяжести (Электронный ресурс. Directive 2010/63/eu of The European Parliament And Of The Council of 22 September 2010. Режим доступа: ttps://eurlex.Europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:EN:PDF (Дата обращения 07.12.2019)).

Перед началом каждого эксперимента животные акклиматизировались к условиям содержания в течение 10 дней, находясь на карантине в отдельном помещении вивария Физиологического отдела им. И.П. Павлова Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины». В течение этого периода времени состояние животных ежедневно контролировалось при общем осмотре в клетке. Животные с неудовлетворительным состоянием отбраковывались, в исследование не включались.

При проведении всех экспериментов осуществлялся контроль параметров окружающей среды. Световой режим: 12 часов ночь – 12 часов день при искусственном освещении. Уход и содержание животных осуществлялось в соответствии со стандартами ФГБНУ «ИЭМ». Животные содержались по 8 особей в клетке, тип клетки IV (площадь пола клетки – 1815 см2); клетки со стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальным разделителем для корма и воды. В качестве подстилочного материала использовали наполнитель растительного происхождения – древесную стружку.

На протяжении всего исследования использовали корм для лабораторных животных: «Комбикорм полнорационный экструдированный для лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков) для содержания», Декларация о соответствии № РОСС RU. ПТ 62. Д 00511 до 04.04.2021 г. НД ТУ 9296-002-70941247-2005 ОК 005-93929619 (ООО «Лабораторкорм», Москва, Россия). Корм давался животным без ограничения. Вода в поилках использовалась бутилированная.

Во всех случаях для формирования экспериментальных групп использовали метод блочной рандомизации.

**2.3 Общая характеристика пациентов**

**Все описываемые в данной части работы исследования построены на анализе вторичных данных. Первичные данные собирались врачами-неврологами при проведении собственных исследований, одобренных Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ».**

В исследование вошли данные, полученные при проведении неврологического осмотра 12 пациентов с диагнозом «эссенциальный тремор», которые проходили обследование на базе Общеполиклинического отделения СПб ГБУЗ «Городская поликлиника №120» за период с 2015 года по 2017 год. Диагноз ЭТ устанавливался врачами-неврологами в соответствии с критериями Общества «Movement Disorder Society on tremor» от 1998 г. [218] [9827589]. Критериями включения в исследование были: установленный диагноз «эссенциальный тремор»; подписанное больным информированное согласие на участие в исследовании, проводимого в рамках диссертационной работы на тему: «Нейробиологические основы гетерогенности эссенциального тремора», руководитель - Зав. Физиологическим отделом им. И.П. Павлова, д.м.н., профессор В.М. Клименко, соискатель – научный сотрудник Физиологического отдела им. И.П. Павлова, врач-невролог Муружева З.М. (Протокол ЛЭК №3/16 от 20.10.2016 г.). Пациенты исключались из исследования при наличии заболевания, которое могло повлиять на оценку выраженности симптомов ЭТ. Всего в исследовании вошло 6 мужчин и 6 женщин в возрасте 55-65 лет. Оценка степени выраженности заболевания проводилась по Шкале оценки тяжести тремора Fahn-Tolosa-Marin (FTM), валидизированной для эссенциального тремора [219] [17343274]. В зависимости от степени выраженности тремора, оцененной по шкале FTM, пациенты были разделены врачами-неврологами на две равные по численности и гендерному составу подгруппы – с легким и умеренным тремором (амплитуда <2 см) и с выраженным тремором (амплитуда ≥ 2 см).

В исследование вошли данные, полученные при проведении неврологического осмотра 12 пациентов с диагнозом «болезнь Паркинсона», которые проходили обследование на базе Клиники ФГБУ «НИИЭМ» СЗО РАМН за период с 2010 года по 2016 год. Критериями включения в исследование были: установленный диагноз «болезнь Паркинсона»; подписанное больным информированное согласие на участие в исследовании, проводимого в рамках разработки Медицинской технологии персонифицированной диагностики форм болезни Паркинсона (БП) на основе биомеханических, биохимических, генетических, клинических показателей, руководитель - Зав. Физиологическим отделом им. И.П. Павлова, д.м.н., профессор В.М. Клименко (Протокол ЛЭК № 2/16 от 12.05.2016 г.). Пациенты исключались из исследования при наличии заболевания, которое могло повлиять на оценку выраженности симптомов БП. Всего в исследовании вошло 6 мужчин и 6 женщин в возрасте 59 - 67 лет. Диагноз БП устанавливался в соответствии с критериями Британского банка мозга [220] (1564476). Стадия БП определялась в соответствие с классификацией Хен и Яра в модификации Lindvall [221] (6067254). В зависимости от стадии заболевания пациенты были разделены на две подгруппы – в первую подгруппу вошли 6 пациентов (3 мужчины и 3 женщины) на стадиях 1,0 – 2,0 по шкале Хен и Яра, вторую подгруппу составили 6 пациентов (3 мужчины и 3 женщины) на стадиях 2,5 – 3,0 по шкале Хен и Яра.

В качестве контроля использовались данные, полученные врачами-неврологами при обследовании 12 относительно здоровых добровольцев – 6 мужчин и 6 женщин, которые входили в состав контрольной группы при проведении работ в рамках диссертационного исследования на тему: «Нейробиологические основы гетерогенности эссенциального тремора» (Протокол ЛЭК №3/1); размах выборки по возрасту в этой группе составил от 52 до 67 лет.

Кроме данных о тяжести или стадии заболевания в исследование были включены данные о содержании в периферической крови основных провоспалительных цитокинов и активности кальпаинов. Определение этих параметров было предусмотрено дизайном соответствующих исследований.

**2.4 Дизайн исследований, проводимых с использованием лабораторных животных**

2.4.1 Проведение экспериментов на образцах, полученных от интактных крыс

Для выполнения данного исследования среди животных, прошедших акклиматизацию, случайным образом отбиралось десять самцов. Животных декапитировали, из черепной коробки извлекали головной мозг; из позвоночного столба извлекали спинной мозг на уровне С3-С8. Из головного мозга согласно данным «Атласа мозга крысы в стереотаксических координатах» [222] иссекали следующие области: префронтальная коры, стриатум, гиппокамп, средний мозг, ствол, кора мозжечка. Полученный материал частично использовали для выделения тотальной мРНК, для определения белка и для определения активности кальпаинов согласно пп. 2.6.7 – 2.6.9. Из части стриатумов (от нескольких животных) выделялись синаптосомы согласно п. 2.6.2. Все эксперименты повторялись не менее трех раз.

2.4.2. Схема экспериментов с введением животным субсептической дозы ЛПС

Ввиду большого объема исследования оно проводилось в два равнозначных этапа. В общей сложности в исследование вошло 145 животных, которые случайным образом разделялись на две группы. Первой, контрольной группе, внутрибрюшинно вводили 1 мл апирогенного физиологического раствора, второй, экспериментальной группе, однократно внутрибрюшинно вводили ЛПС в дозе 1 мг/кг веса животного в 1 мл апирогенного физиологического раствора. Далее группы условно обозначали: контрольная группа – контроль; экспериментальная группа – ЛПС. У 15 животных из каждой группы в течение суток после введения препаратов измеряли глубокую температуру тела (см. п.2.5.3). Через 4 часа, 7, 14, 30 и 180 дней у 7 животных из каждой группы анализировали общую активности в тесте «Открытое поле» (см. п. 2.5.1), каждый раз для исследования брали наивных животных. Через 4 и 24 часа, а также через 7, 14, 30 и 180 дней после начала эксперимента декапитировали по 10 животных из группы; собирали плазму крови; мозг извлекали из черепной коробки, из правой и левой гемисферы иссекали стриатум и гиппокамп. Материал, полученный из правой гемисферы от 5-ти животных, использовали для проведения ОТ-ПЦР (см. п. 2.6.11 – 2.6.13), еще от 5-ти животных - для определения содержания и активности кальпаинов (см. п. 2.6.7). Материал, полученный из левой гемисферы от 5-ти животных, использовали для определения содержания моноаминов (см. п. 2.6.14), еще от 5-ти животных – замораживали и использовали для увеличения объема выборки при необходимости. Материал от 3-5 животных использовали для исследования гистологическими методами (см. п. 2.6.16). В некоторых случаях перед декапитацией из хвостовой вены животных путем ее иссечения собирали образец венозной крови.

2.4.3. Схема экспериментов с интраназальным введением животным MnCl2

Ввиду большого объема исследования оно проводилось в два этапа.

Этап первый. Животные были случайным образом разделены на 2 группы: первая – контрольная, вторая – опытная, по 20 крыс в каждой. 90 дней животным экспериментальной группы интраназально вводили 1мг MnCl2 в объеме 20 мкл; животные контрольной группы получали физиологический раствор по аналогичной схеме. Далее группы условно обозначали: контрольная группа – контроль; экспериментальная группа – MnCl2. У всех животных ежедневно оценивалась масса тела. У 10-ти животных из каждой группы на 20-й и 60-й день эксперимента оценивалась походка в тесте «Следы» (см. п. 2.5.2) и у 10-ти животных на 30-й и 90-й день эксперимента оценивалась двигательная активность в тесте «Открытое поле» (см. п. 2.5.1). Через 90 дней после начала эксперимента животных декапитировали; собирали плазму крови; мозг извлекали из черепной коробки, из правой и левой гемисферы иссекали стриатум и гиппокамп. Материал, полученный из правой гемисферы от 7-ми животных, использовали для определения содержания марганца методом ААС (см. п. 2.6.10), еще от 5-ти животных - для определения содержания и активности кальпаинов (см. п. 2.6.7). Материал, полученный из левой гемисферы от 10-ти животных, использовали для определения содержания моноаминов (см. п. 2.6.14), еще от 7-ми животных – для проведения ОТ-ПСР (п. 2.6.11 – 2.6.13). От остальных животных материал замораживали и использовали для увеличения объема выборки при необходимости. В некоторых случаях перед декапитацией из хвостовой вены животных путем ее иссечения собирали образец венозной крови.

Этап второй. Животные были случайным образом разделены на три группы, по 10 особей в каждой. 30 дней животным экспериментальной группы интраназально вводили 1мг MnCl2 в объеме 20 мкл; животные второй экспериментальной группы 30 дней получали интраназально 1мг MnCl2 в объеме 20 мкл и дополнительно интраназально получали ингибитор кальпаина Cast (184-210), 10 мкг/животное; животные контрольной группы получали физиологический раствор по аналогичной схеме. Далее группы условно обозначали: контрольная группа – контроль; экспериментальная группа – MnCl2, вторая экспериментальная группа – MnCl2+ Cast (184-210). У всех животных ежедневно оценивалась масса тела. У всех животных на 20-й и день эксперимента оценивалась походка в тесте «Следы» (см. п. 2.5.2) и на 30-й день - двигательная активность в тесте «Открытое поле» (см. п.2.5.1). На 30-й день эксперимента всех животных декапитировали, собирали плазму крови; мозг извлекали из черепной коробки, из правой и левой гемисферы иссекали стриатум и гиппокамп. Материал, полученный из правой гемисферы от 5-ти животных, использовали для определения содержания марганца методом ААС (см. п. 2.6.10), еще от 5-ти животных - для определения содержания и активности кальпаинов (см. п.2.6.7, 2.6.9), а также определения содержания TH. Материал, полученный из левой гемисферы от 5-ти животных, использовали для определения содержания моноаминов (см. п.2.6.14), еще от 5-ти животных – для проведения ОТ-ПСР (см. п.2.6.11-2.6.13).

**2.5 Методы анализа поведения животных и манипуляции с животными**

2.5.1 Тест «Открытое поле»

Использованная экспериментальная установка представляет собой круглую арену диаметром 100 см с бортами высотой 40 см и двойным дном, в котором имеется 16 отверстий – «норок». Тестирование проводилось в течение 3 мин. Животных перемещали в комнату с экспериментальной установкой за 1 ч до начала тестирования. Эксперимент проводили в промежуток времени с 18 до 22 часов при освещённости поля 25 лк. Арену после каждой крысы протирали 0,6% раствором перекиси водорода для удаления запахов, затем водой для удаления перекиси, после чего вытирали насухо. О поведении животных судили по суммарной пройденной дистанции и времени нахождения в неподвижном состоянии.

С помощью видеокамеры (Logitech c525, Швейцария), установленной на высоте 100 см над центром площадки и направленной вниз, производили видеосъёмку поведения крыс с дальнейшей обработкой видеофайлов в режиме off line. Для определения общей пройденной дистанции в качестве показателя локомоторной активности оценивали весь путь, пройденный животным в тесте, используя оригинальную программу «Программа для исследования поведения мелких лабораторных животных» (ПИПМЛЖ-1, Tracking), разработанную сотрудниками ФГБНУ «НИИ медицины труда» в соавторстве с сотрудниками Физиологического отдела им. И.П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ», что подтверждается Свидетельством о государственной регистрации в Реестре программ для ЭВМ 01.09.2016. № 2016619940.

2.5.2 Оценка параметров походки в тесте «Следы»

Анализ походки по следам (отпечаткам лап) – тест, используемый для анализа двигательной активности. Установка представляет из себя коридор шириной 12 см и длиной 120 см с высотой бортов – 14 см, по которому животное предварительно обучали проходить. По отпечаткам лап оценивали степень координации животного. Так, в случае нормальной локомоции центр следа задней лапы попадал на центр предшествующего следа передней лапы. При нарушениях походки постановка задней лапы становилась вариабельной, и дистанция между следами передней и задней лап увеличивалась тем больше, чем сильнее выражены нарушения. Измеряемые параметры: расстояние в миллиметрах между правой передней и левой передней лапами (пп-лп), расстояние между правой передней и правой задней лапами (пп-пз), расстояние между правой передней и правой передней лапами (пп-пп), расстояние между левой задней и левой задней лапами (лз-лз), левой передней и левой передней лапами (лп-лп), правой задней и правой задней (пз-пз), левой задней и правой задней (лз-пз), левой задней и левой передней лапами (лз-лп).

2.5.3 Измерение глубокой температуры тела у крыс

Перед началом эксперимента всех животных в течение недели приучали к рукам. Температуру тела животных измеряли ректально. Кончик термометра смазывали вазелином и вводили в анальное отверстие на глубину до 12—13 мм при горизонтальном положении животного. Базальную температуру тела фиксировали в течение 7 дней. Все измерения проводили в помещении с температурой воздуха не ниже 250С.

**2.6 Лабораторные методы исследования**

2.6.1 Получение гомогената клеток стриатума

У интактного животного после декапитации извлекали головной мозг. С помощью хирургических инструментов из мозга выделяли необходимую структуру как указано в п. 2.4.1; ткань гомогенизировали в 500 мкл лизирующего буфера; центрифугировали при 12000 g в течение 10 минут. Отбирали супернатант, который использовали для дальнейших манипуляций.

Лизирующий буфер:

50 мМ Hepes pH 7,6

150 мМ NaCl

10% Глицерол

0,11% Triton X-100

5мМ ЭДТА

10мМ бета-меркаптоэтанолt

2.6.2 Получение синаптосом

Все процедуры проводили на "ледяной бане" при +40С. Ткань мозга крысы измельчали скальпелем, а затем гомогенизировали в ручном гомогенизаторе в 5 объемах буфера А:

20 мМ Tris-HCl pH 7,4

0,32 М сахароза,

0,5 мМ ДТТ.

Полученный гомогенат центрифугировали на 1000 g в течение 10 минут. Надосадочную жидкость отбирали, а осадок гомогенизировали еще в 5 объемах буфера А. Полученный гомогенат снова центрифугировали на 1000 g в течение 10 минут. Осадок (фракцию клеточных ядер, загрязненную крупными обломками клеток) отбрасывали. Надосадочные жидкости, полученные после первого и второго центрифугирований, объединяли и подвергали центрифугированию на 15000 g в течение 30 минут. Надосадок отбрасывали, а осадок, содержащий фракцию синаптосом, загрязненных митохондриями и пузырьками несинаптического происхождения ресуспендировали в 0,5 мл буфера А и наслаивали на градиент плотности, образованный 23%, 10% и 3% раствором перколла (по 1,0 мл каждой концентрации в 4 мл пробирках) и центрифугировали при 25000 g на протяжении 30 мин. Собирали фракцию, обогащенную синаптосомами, с раздела фаз 10% и 23% перколла. Синаптосомальную фракцию ресуспендировали в буфере Рингера-Кребса (124 мM NaCl, 1мM CaCl2, 5 мM KCl, 1,3 мM MgCl2, 1,2 мM NaH2PO4, 26 мM, NaHCO3, 10 мM D(+)-глюкозы, 20 мM Hepes-NaOH, pH = 7,4) так, чтобы финальная концентрация составила 1мг белка в 1 мл образца. Полученный препарат синаптосом разделяли на порции и инкубировали при определенных условиях (указаны дополнительно в каждом конкретном случае). После окончания инкубации образец центрифугировали при 15000 g, 10 минут, 4°C; затем отделялась надосадочная жидкость (внесинаптосомальная жидкость) и осадок (синаптосомы).

2.6.3 Определение активности ЛДГ

Отсутствие ЛДГ, оцененное по ферментативной активности, во внесинаптосомальной жидкости после инкубации синаптосом при различных условиях принято рассматривать как признак целостности синаптосом [223] (23083096). Для этих целей при проведении каждого эксперимента измерялась активность ЛДГ во внесинаптосомальной среде синаптосом до воздействия, после воздействия и в лизате синаптосом, полученном путем обработки ультразвуком (Ultrasonic homogenizer HD 4100). Для каждого анализа отбиралось 300 мкл образца в каждом случае. Активность ЛДГ анализировалась с помощью коммерческого набора реактивов Promega (Madison, WI, USA) в полном соответствии с инструкцией. Метод основан на окислении лактата под действием ЛДГ до пирувата и перекиси водорода (H2O2), которая под влиянием пероксидазы (ПОД), 4-аминофеназона (4-AP) и 4-хлорфенола образует красный киноновый комплекс.

2.6.4 Денатурирующий электрофорез в ПААГ

Электрофоретическое разделение белковой пробы проводили в вертикальных пластинах 12%-ного разделяющего (12% акриламид, 0,32% бис-акриламид, 37,5 мМ Tris-HCl pH=8,8 и 10 мкл ПСА и 40 мкл TEMED на 10 мл геля для полимеризации) и 4%-ного (4% акриламид, 0,11% бис- акриламидд, 37,5 мМ Tris-HCl pH=6,8 и 30 мкл ПСА и 30 мкл TEMED на 10 мл геля для полимеризации) концентрирующего полиакриламидного геля. В качестве электродного буфера использовался буфер следующего состава: 0,025 М Tris, 0,192 М глицин, 0,1%-ный ДСН, pH 8,3. Белковые пробы перед нанесением на гель прогревали 2 минуты при +100°С в буфере для нанесения образцов следующего состава: 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8, 2%-ный ДСН, 10%-ный глицерин, 5%-ный бета-меркаптоэтанол, 0,001%-ный бромфеноловый синий. На дорожку наносили по 70 мкг белковой смеси (если не указано иное). Электрофорез проводили около 3 часов при напряженности электрического поля около 16-18 В/см. Сигналом для окончания электрофореза служило достижение лидирующего красителя (бромфенолового синего) конца геля [224] (5432063). В некоторых случаях после электрофореза белковые зоны в геле окрашивали в течение 2-х часов или дольше 0,1%-ным раствором Coomassi Brilliant Blue R-250 (G-250) в 25%-ном растворе изопропанола, приготовленном на 10%-ной уксусной кислоте, и отмывали в 5%-ном изопропаноле, приготовленном на 3%-ной уксусной кислоте или переносили на нитроцеллюлозный фильтр (НЦФ) для последующего иммуноблотинга.

2.6.5 Иммуноблоттинг

Белки, разделенные электрофоретическим методом в ПААГ, переносили на НЦФ методом полусухого электропереноса с помощью перпендикулярно направленного тока в прерывистой системе рН и концентраций Tris-HCl буфера. Перенос осуществляли при постоянной силе тока 200 мА в течение 1 часа (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual // New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition. 1989. Vol. 1– 3). Качество переноса белков контролировали с помощью окрашивания мембран раствором Понсо С (Ponceau S). После переноса проводили неспецифическую «забивку» НЦФ раствором 5%-ного (w/v) раствора обезжиренного молока, приготовленного на PBS, содержащем 0.1% Tween-20 (PBS-T)) в течение ночи при 4°С. Затем НЦФ инкубировали в течение суток со специфическими антителами согласно выбранной концентрации. После инкубации фильтр отмывали в 5% растворе обезжиренного молока, приготовленного на PBS-T, по схеме: 1 раз по 1 минуте, 3 раза по 15 минут. Затем НЦФ инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение часа. После инкубации фильтр отмывали в PBS-T по схеме: 1 раз по 1 минуте, 3 раза по 15 минут, после этого НЦФ выдерживали 5 минут в дистиллированной воде. Иммунные комплексы визуализировали хемилюминесцентным методом, все манипуляции проводили в полном соответствии с инструкцией производителя. Относительное содержание иммунореактивных полипептидов определяли денситометрически с помощью [225] программы ImageJ относительно зон, окрашенных антителами против бета-актина.

2.6.6. Иммунопреципитация

Иммунопреципитацию m-кальпаина проводили из внесинаптосомальной среды после инкубации синаптосом с различными добавками. Для этого к 100 мкл супернатанта добавляли 5 мкл поликлональных антител против m-кальпаина (Abcam №ab 39165) и инкубировали на протяжении ночи при постоянном перемешивании при 4°C. Далее пробы в течение 4 часов инкубировали с 70 мкл 50% сефарозы, конъюгированной с белком А, при постоянном перемешивании и при 4°C. Затем образцы центрифугировали при 3000g 5 минут. Осадок трижды промывали в буфере следующего состава: 150 мM NaCl, 10 мM Tris-HCl pH= 7,4), 1 мM ЭДТА, 0,1% Triton X-100, ,01% бета-меркаптоэтанол. Комплекс разрушали кипячением в течение 5 минут в буфере (но без добавления бета-меркаптоэтанола) для нанесения образцов и затем разделяли в ПААГ согласно п. 2.6.4.

2.6.7 Казеиновая зимография в геле

Для обнаружения ферментативной активности кальпаинов из образцов ткани в неденатурирующих условиях выделяли валовой белок, для этого образец гомогенизировали в 5-10 объёмах лизирующего буфера (150 мМ NaCl, 10% глицин, 0,1% Triton Х-100, 5 мМ ЭДТА, 20 мМ Tris-HCl pH=7,6, 10мМ бета-меркаптоэтанол). Далее образцы центрифугировали 10 минут при 12000 g. Надосадок смешивали с буфером для нанесения образцов следующего состава: 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8, 10%-ный глицерин, 5%-ный бета-меркаптоэтанол, 0,001%-ный бромфеноловый синий. Аналитическое одномерное разделение белков проводили в ПААГ. Для двухступенчатого электрофореза использовали 9% ПААГ в качестве разделяющего геля (9% акриламид, 0,32% бис-акриламид, 37,5 мМ Tris-HCl pH=8,8 с добавлением 20 мг казеина на 10 мл геля) и 4% ПААГ в качестве концентрирующего геля (4% акриламид, 0,11% бис-акриламид, 37,5 мМ Tris-HCl pH=6,8). Перед электрофорезом проводили «префорез» в течение 30-60 мин при напряженности электрического тока 10-15 В/см. После чего на дорожку наносили по 70 мкг суммарного белка. Электрофоретическое разделение вели до выхода из геля лидирующего красителя.

После окончания электрофореза гель переносили в активационный буфер (5 мМ CaCl2, 10мМ бета-меркаптоэтанол, 20 мМ Tris-HCl pH=7,0,) на 1 час. Затем гель ополаскивали дистиллированной водой и переносили в активационный буфер аналогичного состава, но с pH=7,2 и оставляли на ночь. На следующий день снова ополаскивали гель в дистиллированной воде и переносили его в активационный буфер аналогичного состава, но с pH=7,4 и выдерживали 1 час. Затем ПААГ окрашивали с помощью красителя Coomassie brilliant blue R-250. Об активности кальпаинов суди по площади непокрашенных красителем зон; изоформу кальпаина устанавливали, исходя из положения зоны относительно стандартного (коммерческого) образца µ- и m-кальпаина [226] (7771786)

2.6.8 Модифицированный метод казеиновой зимографии в геле

Для выявления способности веществ напрямую активировать кальпаины использовали модифицированный метод казеиновой зимографии в геле. Для этого согласно п. 2.4.1 получали гомогенат мозга крысы; разделяли пробы электрофоретически в неденатурирующих условиях в геле сополимеризованном с казеином согласно п. 2.6.7 при этом на каждую дорожку наносили одинаковый объем из одной и той же пробы. Затем гель разрезали вдоль на три одинаковый части. Одну часть инкубировали в активационном буфере (5 мМ CaCl2, 10мМ бета-меркаптоэтанол, 20 мМ Tris-HCl pH=7,0, затем pH=7,2 и pH=7,4). Вторую часть инкубировали в аналогичных условиях, но вместо 5 мМ CaCl2 добавляли 10 мМ NaCl (отрицательный контроль – в отсутствии кальция в среде кальпаины не активируются). Третью часть геля инкубировали в аналогичных условиях, но 5 мМ CaCl2 заменяли на вещество интереса. Идентификацию активности кальпаинов проводили как в п.2.6.7

2.6.9 Казеиновая зимография в растворе

Исследуемый образец разбавляли буфером (250 мM Tris-HCl, pH=7,4, 150 мM KCl, 2 мМ СaCl2, 0,01% FITC-казеин) в отношении 1:1 и инкубировали при 250С в течение необходимого времени, которое указано в каждом случае отдельно. После инкубации образец смешивали с буфером для нанесения образцов следующего состава: 0,0625 M Tris-HCl pH 6,8, 2%-ный ДСН, 10%-ный глицерин, 5%-ный бета-меркаптоэтанол, 0,001%-ный бромфеноловый синий. Образец подвергали электрофоретическому разделению, зоны FITC-казеина визуализировали с помощью Molecular Imager GelDoc XR+, Bio-Rad при 280 нм.

2.6.10 Атомно-абсорбционная спектрометрия

Образцы ткани взвешивали и гомогенизировали в трех объемах деионизованной воды с сопротивлением не менее 10 МОм/см (воду с данными характеристиками получали с помощью системы очисти воды Milli-Q Direct, картридж Прогард Т3). К гомогенату добавляли концентрированную азотную кислоту (1:1 v/v) и инкубировали ночь при комнатной температуре (до полного растворения материала).

Анализ уровня марганца проводили на спектрофотометре ZEEnit 650 P производства фирмы Analytik Jena (Германия). Средства поверки прибора: государственные стандартные образцы водных растворов ионов марганца (ГСО 7443-98). Все калибровочные растворы готовили на деионизованной воде с описанными выше характеристиками. Концентрацию марганца в образцах измеряли в двуполевом режиме, который за счет изменения величины напряженности магнитного поля позволяет продолжить калибровочную кривую вплоть до 1000 мкг/мл. Для каждого образца анализ проводили дважды. Результаты измерения нормировали на массу образца и представляли как нг/г ткани.

2.6.11 Выделение тотальной мРНК

Выделение тотальной мРНК производили с помощью метода выделения РНК и ДНК TRI REAGENTТМ (Sigma, США). На пробу весом 25-50 мкг добавляли 500 мкл реагента для выделения. Гомогенизировали при комнатной температуре. Центрифугировали, отбирали водную фракцию, осадок отбрасывали. В отобранную пробу добавляли хлороформ в объёме 100 мкл, центрифугировали, отбирали надосадок, обогащенный РНК. В надосадок добавляли 500 мкл изопропанола, перемешивали, центрифугировали, жидкую фазу убирали. В пробирку с осадком добавляли 500 мкл 75% этанола, центрифугировали, отбирали водную фазу и высушивали пробу с помощью вакуумного насоса. После чего добавляли RNA’s Free воду в объёме 20 мкл. Пробы хранили в холодильнике при - 70°С до дальнейшего их использования.

Определение концентрации общей РНК в образцах проводили на спектрофотометре (Eppendorf BioPhotometer, Германия). Выравнивание концентраций РНК проводили с учетом данных фотометрирования. Целостность РНК анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле.

2.6.12 Обратная транскрипция

Синтез кДНК с помощью обратной транскрипции проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 1 мкг тотальной РНК, 200 единиц M-MLV обратной транскриптазы, однократный буфер для обратной транскриптазы, эквимолярную смесь четырѐх dNTP по 500 мкМ каждого, 1 мкМ смеси случайных праймеров и 25 единиц ингибитора РНКаз. Перед добавлением в инкубационную смесь РНК со случайными праймерами (фирмы «Syntol», Москва) отжигали в течение 5 мин при 70°C на амплификаторе CFX96 Real-TimeSystem BioRad (США). Реакцию проводили в течение 1 часа при 37°C.

2.6.13 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени

ПЦР проводили по инструкции для проведения ПЦР в реальном времени на аплификаторе CFX96 Real-TimeSystem производства BioRad.

Для проведения ПЦР использовался коммерческий набор реактивов qPCRmix-HSSYBR-5х, содержащий Taq полимеразу, dNTP, буферный раствор и краситель Syber Green в оптимальных для проведения ПЦР концентрациях.

Подбор и проверка специфичности систем праймеров осуществляли с использованием онлайн-сервиса Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), сочетающего в себе алгоритмы подбора/проверки праймеров с помощью Primer3 [227] [17379693] и [228] BLAST (Basic Local Alignment Search Tool 2231712). Для каждого праймера предварительно подбирали оптимальные условия, при которых реакции шли успешно. Последовательность праймеров и условия реакций представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Последовательности используемых праймеров.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Название | Последовательность праймеров  5’ 3’ | Температура отжига ᵒC | Длина продукта |
| *1* | *2* | *3* | *4* |
| GAPDH | F AAACCCATCACCATCTTCCA  R GTGGTTCACACCCATCACA | 60 | 198 |
| Cycr | F GATTTGGCTATAAGGGTTC  R GTTGTCCACAGTCGGAGA | 60 | 357 |
| ИЛ-1β | F TCTTCGAGGCACAAGGCA  R AGAGGTCCAGGTCCTGGAA | 60 | 80 |
| ФНОα | F CCAGGTTCTCTTCAAGGGACAA  R CTCCTGGTATGAAATGGCAAATC | 60 | 85 |
| IBA-1 | F GAAGCGAATGCTGGAGAAAC  R CCTCCAATTAGGGCAACTCA | 58 | 79 |
| NFkB p65 | F CATGCGTTTCCGTTACAAGTGCGA  R TGGGTGCGTCTTAGTGGTATCTGT | 60 | 91 |
| IkB | F TGGCCTTCCTCAACTTCCAGAACA  R TCAGGATCACAGCCAGCTTTCAGA | 60 | 75 |
| µ-кальпаин | F ACCCAGGAACTAGATGACCA  R TACCGTCTCGATCCATGAGG | 57 | 144 |
| m-кальпаин | F AGCCAATGAGGAGGACATTG  R CTCCCATCTTCATCCAGCAT | 60 | 195 |
| кальпастатин | F GCTATCACAGGACCTCTTCCAGA  R GGTGAAATCAGATGACAAGGCA | 60 | 81 |

Во всех случаях ПЦР проводили в трёх параллелях в конечном объеме 10 мкл по следующей программе: «горячий старт» – 95°С 15 мин (активация полимеразы, согласно рекомендациям производителя); далее 50 циклов: 5 с при 95°С (денатурация ДНК-матрицы) и 10с при температуре отжига праймеров и элонгации с регистрацией флюоресценции.

Эффективность ПЦР проверяли в отдельном эксперименте методом серийных разведений. Во всех случаях эффективность была близка к 100%, на основании чего относительное содержание целевых мРНК рассчитывали с использованием 2ΔΔCt метода [229] [11846609.]. Данные нормировали относительно среднего геометрического Ct, определенных для генов домашнего хозяйства. После проведения всех вычислений данные дополнительно нормировали на показатели контрольной группы с пересчетом ошибки как ошибки частного.

2.6.14 Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Образцы ткани гомогенизировали в 0,1М хлорной кислоте и центрифугировали со скоростью 10000g при +40С в течение 30 минут. Супернатант отбирали и фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,2 мкм (Whatman, США). На анализ брали 20 мкл образца. ВЭЖХ проводили в изократических условиях с использованием обращённо-фазовой колонки (длина алкильной цепи C18) с последующей электрохимической детекцией. Количественное определение уровня моноаминов проводили с применением метода внешнего стандарта. Состав подвижной фазы: 75мМ фосфатный буфер, содержащий 2мМ лимонной кислоты (pH 4,6); 0,1 мМ октансульфоновой кислоты и 15% ацетонитрила (V/V). Электрохимическая детекция осуществлялась стеклоуглеродным электродом при +700 мВ. Количество моноаминов в образце выражали в нг/мг белка, затем нормировали на контрольную группу и выражали в % относительно контрольной группы; ошибку пересчитывали как ошибку частного. Ниже представлены хроматограммы смеси внешних стандартов в концентрации 5 нг/мл (рис.2.1) и пример хроматограммы, полученной при анализе содержания моноаминов в гомогенате клеток стриатума крысы контрольной группы (рис.2.2).

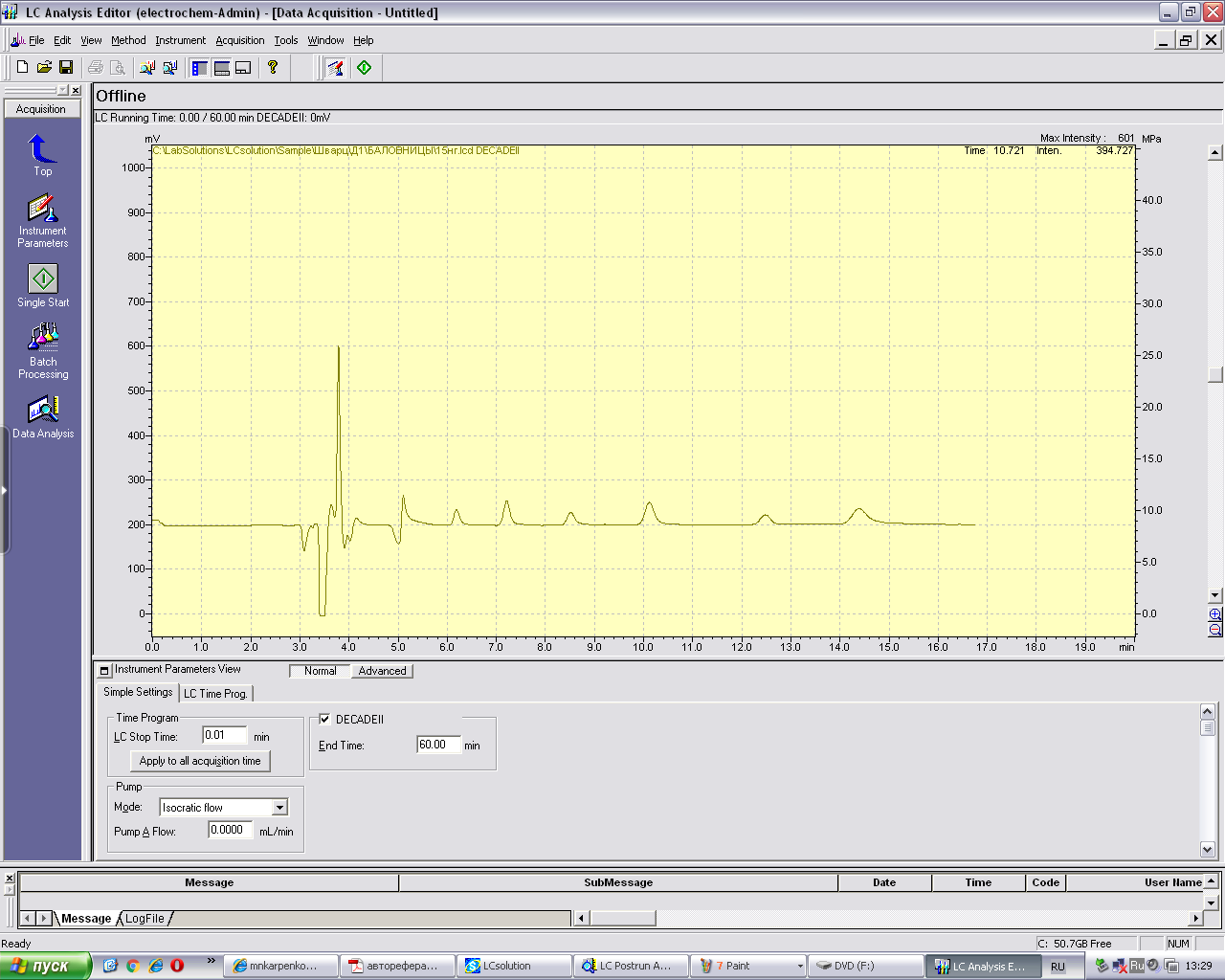


Рисунок 2.1 – Хроматограмма смеси внешних стандартов в концентрации 5нг/мл. Порядок выхода стандартов после пика ввода, заканчивающегося на 5-ой минуте: норадреналин, дофамин, 3,4-диоксифенилуксусная кислота, 5-оксииндолилуксусная кислота, серотонин, гомованилиновая кислота.

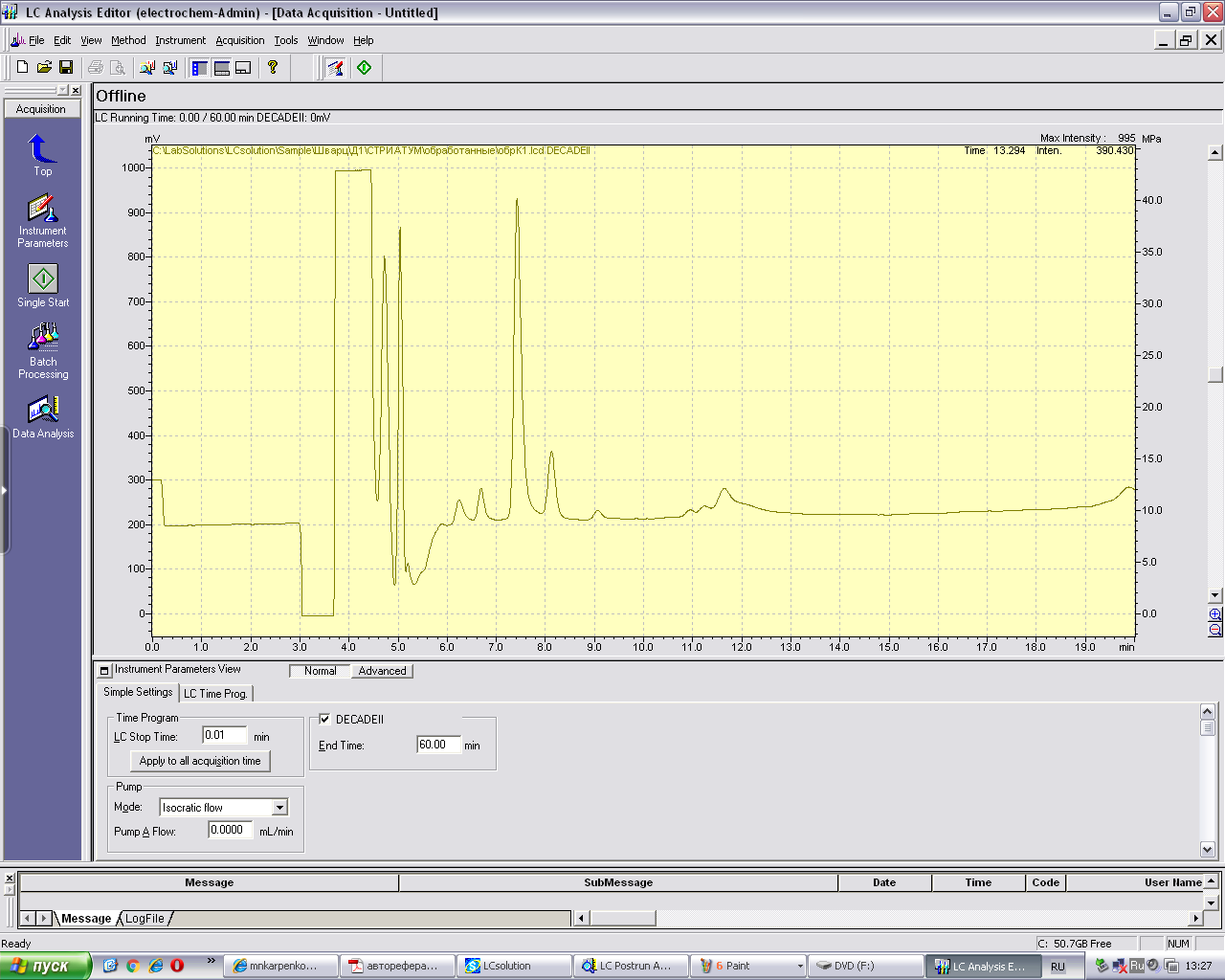


Рисунок 2.2 – Пример хроматограммы, полученной при анализе содержания моноаминов в гомогенате клеток стриатума крысы контрольной группы.

2.6.15 Определение содержания ИЛ-1β, ФНО-альфа в плазме крови крыс

Содержания ИЛ-1β, ФНО-альфа в плазме крови крыс определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора реактивов: для определения уровня ИЛ-1бета использовали кит № ab100767, Abcam; для определения ФНОальфа - № ab46070, Abcam в полном соответствии с инструкцией. В обоих случаях значение R2 при построение калибровочной кривой составляло не менее 0,95. Диапазон обнаружения для ИЛ-1β составил (68,59 – 50000) пг/мл, чувствительность < 80 пг/мл; ФНОальфа – (31.25 – 1000) пг/мл, чувствительность < 15 пг/мл.

2.6.16 Гистологические методы исследования

Головной мозг животных помещали в 10% раствор нейтрального формалина на 2 суток (в объеме, превышающем объем мозга в 30-40 раз). После фиксатора мозг промывали в проточной воде в течение суток, обезвоживали в спиртах восходящей крепости (сутки в 70 %, сутки в 90%, сутки в первой смене 96%, сутки во второй смене 96%), проводили через 2 смены абсолютного спирта (1сутки в каждой смене), пропитывали ткань смесью петролейного эфира и абсолютного спирта 45 минут, держали в двух сменах петролейного эфира по 60 минут и, наконец, оставляли в смеси петролейного эфира и парафина на ночь в термостате при 370С. На следующий день мозг животных проводили через 2 смены расплавленного парафина при 570С и заливали в парафиновые блоки.

Парафиновые срезы толщиной 7 мкм изготавливали на ротационном микротоме (Leica RM 2125RT, Германия). Для проведения гистологических и иммуногистохимических реакций предметные стекла обрабатывали запатентованным составом на основе бычьего сывороточного альбумина (BSA) (патент RU 2 386 137 C1) или использовали предметные стекла с поли-L-лизиновым покрытием. На каждом предметном стекло располагалось по 4 - 8 фронтальных срезов головного мозга. Для каждой реакции брали по два предметных стекла со срезами анализируемых областей мозга: черной субстанции или гиппокампа. Идентификацию структур мозга проводили по атласу Паксиноса и Уотсона [Paxinos, G., Watson, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press. 1986..

Для проведения иммуногистохимической реакции на тирозингидроксилазу использовался протокол, указанный в Руководстве Д.Э. Коржевского [230][Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники. СПб.: СпецЛит, 2010. 95 с.]. Для окрашивания нервной ткани по методу Ниссля толуидиновым синим, использовался следующий протокол. Проводили депарафинирование срезов в ксилоле и проведение через спирты с нисходящей крепостью до дистиллированной воды; окрашивание срезов в растворе 0,1 % толуидинового синего, 15-30 мин; промывку в дистиллированой воде; дифференцировку под микроскопом в 96%-ном этаноле с добавлением ледяной уксусной кислоты до исчезновения фоновой окраски нейропиля; промывку в 96% -ном этаноле; обезвоживание в абсолютном этаноле; просветление препаратов в ксилоле; заключение препаратов в синтетическую среду Cytoseal (ThermoScientific, США).

Анализ гистологических препаратов проводили на микроскопе Leica DM750 (Германия) с помощью фотокамеры ICC50 и программы обработки изображений LASEZ (Leica, Германия).

2**.7 Компьютерные программы и базы данных, использованные в работе**

Поиск сигнальных пептидов, определяющих способность кальпаинов секретироваться клетками по классическому пути, проводился с помощью инструмента PrediSi [231] (http://www.predisi.de). Вероятность секреции кальпаинов клетками по неклассическому пути рассчитывалась с помощью сервиса SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP2.0> согласно рекомендациям, указанным в [232] (15115854).

Поиск потенциальных субстратов кальпаина среди внеклеточных белков проводили с помощью базы данных CaMPDB, Calpain for Modulatory Proteolysis Database [233] (<http://www.calpain.org/predict.rb?cls=substrate>).

Выравнивание аминокислотных последовательностей осуществляли в MultAlin [234] (http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html)

**2.8 Методы математической статистики**

Обработка данных производилась с использованием пакета статистических программ «Statistica 10.0» (StatSoft, США). Нормальность распределения проверяли критерием Шапиро-Уилка. Для регистрируемых количественных переменных, в случае нормальности распределения, рассчитывались среднее значение параметра в группе (Mean) и ошибка среднего (±SEМ). Данные для контрольных и экспериментальных групп подвергались статистической оценке с использованием параметрических (дисперсионный анализ, тест Тьюки) или непараметрических критериев (Краскела-Уоллиса и Ньюмана-Кейлса). Для сравнения долей использовался точный критерий Фишера с поправкой на множественные сравнения. Значимыми считались различия при р ≤ 0,05.

1. GUROFF G. A NEUTRAL, CALCIUM-ACTIVATED PROTEINASE FROM THE SOLUBLE FRACTION OF / GUROFF G. // The Journal of biological chemistry – 1964. – Т. 239 – С.149–155.

2. Huston R.B. Activation of Skeletal Muscle Phosphorylase Kinase by Ca2+. II. Identification of the Kinase Activating Factor as a Proteolytic Enzyme / Huston R.B., Krebs E.G. // Biochemistry – 1968. – Т. 7 – № 6 – С.2116–2122.

3. Murachi T. Intracellular Ca2+-dependent protease (CALPAIN) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (CALPASTATIN) / Murachi T., Tanaka K., Hatanaka M., Murakami T. // Advances in Enzyme Regulation – 1981. – Т. 19 – № C – С.407–424.

4. Wheelock M.J. Evidence for two structurally different forms of skeletal muscle Ca2+-activated protease. / Wheelock M.J. // The Journal of biological chemistry – 1982. – Т. 257 – № 21 – С.12471–4.

5. Goll D.E. The calpain system // Physiol. Rev. – 2003. – Т. 83. – № 3. – 731–801с.

6. Miyake S. Gene organization of the small subunit of human calcium-activated neutral protease / Miyake S., Emori Y., Suzuki K. // Nucleic Acids Research – 1986. – Т. 14 – № 22 – С.8805–8817.

7. Asangani I.A. NRF-1, and AP-1 regulate the promoter of the human calpain small subunit 1 (CAPNS1) gene. / Asangani I.A., Rasheed S.A.K., Leupold J.H., Post S., Allgayer H. // Gene – 2008. – Т. 410 – № 1 – С.197–206.

8. Hata A. Transcriptional activation of the gene for the large subunit of human m-calpain by 12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. / Hata A., Ohno S., Suzuki K. // FEBS letters – 1992. – Т. 304 – № 2–3 – С.241–4.

9. Cui X. A g.-1256 A>C in the promoter region of CAPN1 is associated with semen quality traits in Chinese Holstein bulls. / Cui X., Sun Y., Wang X., Yang C., Ju Z., Jiang Q., Zhang Y., Huang J., Zhong J., Yin M., Wang C. // Reproduction (Cambridge, England) – 2016. – Т. 152 – № 1 – С.101–9.

10. Li X. An association between the calpastatin (CAST) gene and keratoconus. / Li X., Bykhovskaya Y., Tang Y.G., Picornell Y., Haritunians T., Aldave A.J., Szczotka-Flynn L., Iyengar S.K., Rotter J.I., Taylor K.D., Rabinowitz Y.S. // Cornea – 2013. – Т. 32 – № 5 – С.696–701.

11. Temel Ş.G. A novel homozygous nonsense mutation in CAST associated with PLACK syndrome. / Temel Ş.G., Karakaş B., Şeker Ü., Turkgenç B., Zorlu Ö., Sarıcaoğlu H., Oğur Ç., Kütük Ö., Kelsell D.P., Yakıcıer M.C. // Cell and tissue research – 2019. – Т. 378 – № 2 – С.267–277.

12. Ishida S. Rat calpastatin has diverged primary sequence from other mammalian calpastatins but retains functionally important sequences. / Ishida S., Emori Y., Suzuki K. // Biochimica et biophysica acta – 1991. – Т. 1088 – № 3 – С.436–8.

13. Tullio R. De Multiple rat brain calpastatin forms are produced by distinct starting points and alternative splicing of the N-terminal exons. / Tullio R. De, Averna M., Stifanese R., Parr T., Bardsley R.G., Pontremoli S., Melloni E. // Archives of biochemistry and biophysics – 2007. – Т. 465 – № 1 – С.148–56.

14. Wendt A. Interaction of calpastatin with calpain: a review. / Wendt A., Thompson V.F., Goll D.E. // Biological chemistry – 2004. – Т. 385 – № 6 – С.465–72.

15. Hosfield C.M. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. / Hosfield C.M., Elce J.S., Davies P.L., Jia Z. // The EMBO journal – 1999. – Т. 18 – № 24 – С.6880–9.

16. Strobl S. The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. / Strobl S., Fernandez-Catalan C., Braun M., Huber R., Masumoto H., Nakagawa K., Irie A., Sorimachi H., Bourenkow G., Bartunik H., Suzuki K., Bode W. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2000. – Т. 97 – № 2 – С.588–92.

17. Suzuki K. Structure, activation, and biology of calpain. / Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H. // Diabetes – 2004. – Т. 53 Suppl 1 – С.S12-8.

18. Masumoto H. Crystallization and preliminary X-ray analysis of recombinant full-length human m-calpain. / Masumoto H., Nakagawa K., Irie S., Sorimachi H., Suzuki K., Bourenkov G.P., Bartunik H., Fernandez-Catalan C., Bode W., Strobl S. // Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography – 2000. – Т. 56 – № Pt 1 – С.73–5.

19. Moldoveanu T. A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain. / Moldoveanu T., Hosfield C.M., Lim D., Elce J.S., Jia Z., Davies P.L. // Cell – 2002. – Т. 108 – № 5 – С.649–60.

20. Sondermann H. C2 can do it, too. / Sondermann H., Kuriyan J. // Cell – 2005. – Т. 121 – № 2 – С.158–60.

21. Farah C.A. The role of C2 domains in PKC signaling. / Farah C.A., Sossin W.S. // Advances in experimental medicine and biology – 2012. – Т. 740 – С.663–83.

22. Fernández-Montalván A. Electrostatic interactions of domain III stabilize the inactive conformation of mu-calpain. / Fernández-Montalván A., Assfalg-Machleidt I., Pfeiler D., Fritz H., Jochum M., Machleidt W. // The Biochemical journal – 2004. – Т. 382 – № Pt 2 – С.607–17.

23. Campbell R.L. Structure-function relationships in calpains. / Campbell R.L., Davies P.L. // The Biochemical journal – 2012. – Т. 447 – № 3 – С.335–51.

24. Vilei E.M. Functional properties of recombinant calpain I and of mutants lacking domains III and IV of the catalytic subunit. / Vilei E.M., Calderara S., Anagli J., Berardi S., Hitomi K., Maki M., Carafoli E. // The Journal of biological chemistry – 1997. – Т. 272 – № 41 – С.25802–8.

25. Villalobo A. Proteins with calmodulin-like domains: structures and functional roles. / Villalobo A., González-Muñoz M., Berchtold M.W. // Cellular and molecular life sciences : CMLS – 2019. – Т. 76 – № 12 – С.2299–2328.

26. Dennison S.R. Investigations into the membrane interactions of m-calpain domain V. / Dennison S.R., Dante S., Hauss T., Brandenburg K., Harris F., Phoenix D.A. // Biophysical journal – 2005. – Т. 88 – № 4 – С.3008–17.

27. Schád E. A novel human small subunit of calpains. / Schád E., Farkas A., Jékely G., Tompa P., Friedrich P. // The Biochemical journal – 2002. – Т. 362 – № Pt 2 – С.383–8.

28. Friedrich P. Differential distribution of calpain small subunit 1 and 2 in rat brain. / Friedrich P., Papp H., Halasy K., Farkas A., Farkas B., Tompa P., Kása P. // The European journal of neuroscience – 2004. – Т. 19 – № 7 – С.1819–25.

29. Maki M. A growing family of the Ca2+-binding proteins with five EF-hand motifs. / Maki M., Narayana S. V, Hitomi K. // The Biochemical journal – 1997. – Т. 328 ( Pt 2 – С.718–20.

30. Inomata M. Activation mechanism of calcium-activated neutral protease. Evidence for the existence of intramolecular and intermolecular autolyses. / Inomata M., Kasai Y., Nakamura M., Kawashima S. // The Journal of biological chemistry – 1988. – Т. 263 – № 36 – С.19783–7.

31. Moldoveanu T. Calpain activation by cooperative Ca2+ binding at two non-EF-hand sites. / Moldoveanu T., Jia Z., Davies P.L. // The Journal of biological chemistry – 2004. – Т. 279 – № 7 – С.6106–14.

32. Nakagawa K. Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. / Nakagawa K., Masumoto H., Sorimachi H., Suzuki K. // Journal of biochemistry – 2001. – Т. 130 – № 5 – С.605–11.

33. Hanna R.A. Calcium-bound structure of calpain and its mechanism of inhibition by calpastatin. / Hanna R.A., Campbell R.L., Davies P.L. // Nature – 2008. – Т. 456 – № 7220 – С.409–12.

34. Chakraborti S. Implications of calpains in health and diseases. / Chakraborti S., Alam M.N., Paik D., Shaikh S., Chakraborti T. // Indian journal of biochemistry & biophysics – 2012. – Т. 49 – № 5 – С.316–28.

35. Cong J. The role of autolysis in activity of the Ca2+-dependent proteinases (mu-calpain and m-calpain). / Cong J., Goll D.E., Peterson A.M., Kapprell H.P. // The Journal of biological chemistry – 1989. – Т. 264 – № 17 – С.10096–103.

36. Chakrabarti A.K. Regulation of brain m calpain Ca2+ sensitivity by mixtures of membrane lipids: activation at intracellular Ca2+ level. / Chakrabarti A.K., Dasgupta S., Gadsden R.H., Hogan E.L., Banik N.L. // Journal of neuroscience research – 1996. – Т. 44 – № 4 – С.374–80.

37. Fernández-Montalván A. Mu-calpain binds to lipid bilayers via the exposed hydrophobic surface of its Ca2+-activated conformation. / Fernández-Montalván A., Assfalg-Machleidt I., Pfeiler D., Fritz H., Jochum M., Machleidt W. // Biological chemistry – 2006. – Т. 387 – № 5 – С.617–27.

38. Hood J.L. Differential compartmentalization of the calpain/calpastatin network with the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. / Hood J.L., Brooks W.H., Roszman T.L. // The Journal of biological chemistry – 2004. – Т. 279 – № 41 – С.43126–35.

39. Alexa A. Contribution of distinct structural elements to activation of calpain by Ca2+ ions. / Alexa A., Bozóky Z., Farkas A., Tompa P., Friedrich P. // The Journal of biological chemistry – 2004. – Т. 279 – № 19 – С.20118–26.

40. Baki A. Autolysis parallels activation of mu-calpain. / Baki A., Tompa P., Alexa A., Molnár O., Friedrich P. // The Biochemical journal – 1996. – Т. 318 ( Pt 3 – С.897–901.

41. Elce J.S. Autolysis, Ca2+ requirement, and heterodimer stability in m-calpain. / Elce J.S., Hegadorn C., Arthur J.S. // The Journal of biological chemistry – 1997. – Т. 272 – № 17 – С.11268–75.

42. Cottin P. Autolysis of mu- and m-calpain from bovine skeletal muscle. / Cottin P., Thompson V.F., Sathe S.K., Szpacenko A., Goll D.E. // Biological chemistry – 2001. – Т. 382 – № 5 – С.767–76.

43. Guttmann R.P. Oxidation inhibits substrate proteolysis by calpain I but not autolysis. / Guttmann R.P., Elce J.S., Bell P.D., Isbell J.C., Johnson G. V // The Journal of biological chemistry – 1997. – Т. 272 – № 3 – С.2005–12.

44. Dutt P. m-Calpain subunits remain associated in the presence of calcium. / Dutt P., Arthur J.S., Croall D.E., Elce J.S. // FEBS letters – 1998. – Т. 436 – № 3 – С.367–71.

45. Tullio R. De Unexpected role of the L-domain of calpastatin during the autoproteolytic activation of human erythrocyte calpain. / Tullio R. De, Franchi A., Martines A., Averna M., Pedrazzi M., Melloni E., Sparatore B. // Bioscience reports – 2018. – Т. 38 – № 2.

46. Sparatore B. A new human calpastatin skipped of the inhibitory region protects calpain-1 from inactivation and degradation. / Sparatore B., Pedrazzi M., Garuti A., Franchi A., Averna M., Ballestrero A., Tullio R. De // Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research – 2019. – Т. 1866 – № 8 – С.1260–1271.

47. Glading A. Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. / Glading A., Bodnar R.J., Reynolds I.J., Shiraha H., Satish L., Potter D.A., Blair H.C., Wells A. // Molecular and cellular biology – 2004. – Т. 24 – № 6 – С.2499–512.

48. Zadran S. Brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor activate neuronal m-calpain via mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation. / Zadran S., Jourdi H., Rostamiani K., Qin Q., Bi X., Baudry M. // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience – 2010. – Т. 30 – № 3 – С.1086–95.

49. Smith S.D. Glutamate substitutions at a PKA consensus site are consistent with inactivation of calpain by phosphorylation. / Smith S.D., Jia Z., Huynh K.K., Wells A., Elce J.S. // FEBS letters – 2003. – Т. 542 – № 1–3 – С.115–8.

50. Du M. Effects of phosphorylation on μ-calpain activity at different incubation temperature. / Du M., Li X., Li Z., Shen Q., Wang Y., Li G., Zhang D. // Food research international (Ottawa, Ont.) – 2017. – Т. 100 – № Pt 2 – С.318–324.

51. Du M. Phosphorylation regulated by protein kinase A and alkaline phosphatase play positive roles in μ-calpain activity. / Du M., Li X., Li Z., Shen Q., Wang Y., Li G., Zhang D. // Food chemistry – 2018. – Т. 252 – С.33–39.

52. Averna M. Interaction between calpain-1 and HSP90: new insights into the regulation of localization and activity of the protease. / Averna M., Tullio R. De, Pedrazzi M., Bavestrello M., Pellegrini M., Salamino F., Pontremoli S., Melloni E. // PloS one – 2015. – Т. 10 – № 1 – С.e0116738.

53. Melloni E. Association of calpastatin with inactive calpain: a novel mechanism to control the activation of the protease? / Melloni E., Averna M., Stifanese R., Tullio R. De, Defranchi E., Salamino F., Pontremoli S. // The Journal of biological chemistry – 2006. – Т. 281 – № 34 – С.24945–54.

54. Kent M.P. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. / Kent M.P., Spencer M.J., Koohmaraie M. // Journal of animal science – 2004. – Т. 82 – № 3 – С.794–801.

55. Du M. Calpastatin inhibits the activity of phosphorylated μ-calpain in vitro. / Du M., Li X., Li Z., Shen Q., Ren C., Zhang D. // Food chemistry – 2019. – Т. 274 – С.743–749.

56. Tompa P. Calpastatin subdomains A and C are activators of calpain. / Tompa P., Mucsi Z., Orosz G., Friedrich P. // The Journal of biological chemistry – 2002. – Т. 277 – № 11 – С.9022–6.

57. Tullio R. De Differential degradation of calpastatin by mu- and m-calpain in Ca(2+)-enriched human neuroblastoma LAN-5 cells. / Tullio R. De, Averna M., Salamino F., Pontremoli S., Melloni E. // FEBS letters – 2000. – Т. 475 – № 1 – С.17–21.

58. Sato K. Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. / Sato K., Kawashima S. // Biological chemistry – 2001. – Т. 382 – № 5 – С.743–51.

59. Stabach P.R. Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility. / Stabach P.R., Cianci C.D., Glantz S.B., Zhang Z., Morrow J.S. // Biochemistry – 1997. – Т. 36 – № 1 – С.57–65.

60. DuVerle D.A. Calpain cleavage prediction using multiple kernel learning. / DuVerle D.A., Ono Y., Sorimachi H., Mamitsuka H. // PloS one – 2011. – Т. 6 – № 5 – С.e19035.

61. Sorimachi H. Understanding the substrate specificity of conventional calpains. / Sorimachi H., Mamitsuka H., Ono Y. // Biological chemistry – 2012. – Т. 393 – № 9 – С.853–71.

62. McCartney C.-S.E. An easy-to-use FRET protein substrate to detect calpain cleavage in vitro and in vivo. / McCartney C.-S.E., MacLeod J.A., Greer P.A., Davies P.L. // Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research – 2018. – Т. 1865 – № 2 – С.221–230.

63. McCartney C.-S.E. FRET-Based Assays to Determine Calpain Activity. / McCartney C.-S.E., Davies P.L. // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) – 2019. – Т. 1915 – С.39–55.

64. Cuerrier D. Determination of peptide substrate specificity for mu-calpain by a peptide library-based approach: the importance of primed side interactions. / Cuerrier D., Moldoveanu T., Davies P.L. // The Journal of biological chemistry – 2005. – Т. 280 – № 49 – С.40632–41.

65. Shinkai-Ouchi F. Predictions of Cleavability of Calpain Proteolysis by Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis Using Newly Determined Cleavage Sites and Catalytic Efficiencies of an Oligopeptide Array. / Shinkai-Ouchi F., Koyama S., Ono Y., Hata S., Ojima K., Shindo M., DuVerle D., Ueno M., Kitamura F., Doi N., Takigawa I., Mamitsuka H., Sorimachi H. // Molecular & cellular proteomics : MCP – 2016. – Т. 15 – № 4 – С.1262–80.

66. Gu X. Capillary electrophoretic analysis of mu- and m-calpain using fluorescently labeled casein substrates. / Gu X., Whipple-VanPatter G., O’Dwyer M., Zeece M. // Electrophoresis – 2001. – Т. 22 – № 11 – С.2336–42.

67. Lisa F. Di Specific degradation of troponin T and I by mu-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. / Lisa F. Di, Tullio R. De, Salamino F., Barbato R., Melloni E., Siliprandi N., Schiaffino S., Pontremoli S. // The Biochemical journal – 1995. – Т. 308 ( Pt 1 – С.57–61.

68. Morford L.A. Calpain II colocalizes with detergent-insoluble rafts on human and Jurkat T-cells. / Morford L.A., Forrest K., Logan B., Overstreet L.K., Goebel J., Brooks W.H., Roszman T.L. // Biochemical and biophysical research communications – 2002. – Т. 295 – № 2 – С.540–6.

69. Bartoli M. Calpains in muscle wasting. / Bartoli M., Richard I. // The international journal of biochemistry & cell biology – 2005. – Т. 37 – № 10 – С.2115–33.

70. Ma X. Differential activation of the calpain system involved in individualized adaptation of different fast-twitch muscles in hibernating Daurian ground squirrels. / Ma X., Chang H., Wang Z., Xu S., Peng X., Zhang J., Yan X., Lei T., Wang H., Gao Y. // Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985) – 2019. – Т. 127 – № 2 – С.328–341.

71. Takano J. Vital role of the calpain-calpastatin system for placental-integrity-dependent embryonic survival. / Takano J., Mihira N., Fujioka R., Hosoki E., Chishti A.H., Saido T.C. // Molecular and cellular biology – 2011. – Т. 31 – № 19 – С.4097–106.

72. Li J. Regional differences in gene expression for calcium activated neutral proteases (calpains) and their endogenous inhibitor calpastatin in mouse brain and spinal cord. / Li J., Grynspan F., Berman S., Nixon R., Bursztajn S. // Journal of neurobiology – 1996. – Т. 30 – № 2 – С.177–91.

73. Goto K. Localization of mRNAs for calpain and calpastatin in the adult rat brain by in situ hybridization histochemistry. / Goto K., Iwamoto T., Kondo H. // Brain research. Molecular brain research – 1994. – Т. 23 – № 1–2 – С.40–6.

74. Shields D.C. Calpain expression varies among different rat and bovine central nervous system regions. / Shields D.C., Ray S.K., Gantt-Wilford G., Banik N.L. // Journal of neuroscience research – 1998. – Т. 53 – № 4 – С.482–9.

75. Li Y. Calpain 1 and Calpastatin expression is developmentally regulated in rat brain. / Li Y., Bondada V., Joshi A., Geddes J.W. // Experimental neurology – 2009. – Т. 220 – № 2 – С.316–9.

76. Perlmutter L.S. Distribution of calcium-activated protease calpain in the rat brain. / Perlmutter L.S., Gall C., Baudry M., Lynch G. // The Journal of comparative neurology – 1990. – Т. 296 – № 2 – С.269–76.

77. Baudry M. Learning and memory: an emergent property of cell motility. / Baudry M., Bi X. // Neurobiology of learning and memory – 2013. – Т. 104 – С.64–72.

78. Dong Z. Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. / Dong Z., Han H., Li H., Bai Y., Wang W., Tu M., Peng Y., Zhou L., He W., Wu X., Tan T., Liu M., Wu X., Zhou W., Jin W., Zhang S., Sacktor T.C., Li T., Song W., Wang Y.T. // The Journal of clinical investigation – 2015. – Т. 125 – № 1 – С.234–47.

79. Gil-Parrado S. Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain. / Gil-Parrado S., Popp O., Knoch T.A., Zahler S., Bestvater F., Felgenträger M., Holloschi A., Fernández-Montalván A., Auerswald E.A., Fritz H., Fuentes-Prior P., Machleidt W., Spiess E. // The Journal of biological chemistry – 2003. – Т. 278 – № 18 – С.16336–46.

80. Rock M.T. Calcium-dependent signaling pathways in T cells. Potential role of calpain, protein tyrosine phosphatase 1b, and p130Cas in integrin-mediated signaling events. / Rock M.T., Brooks W.H., Roszman T.L. // The Journal of biological chemistry – 1997. – Т. 272 – № 52 – С.33377–83.

81. Duquette P.M. The calcium-activated protease calpain regulates netrin-1 receptor deleted in colorectal cancer-induced axon outgrowth in cortical neurons. / Duquette P.M., Lamarche-Vane N. // Journal of neurochemistry – 2020. – Т. 152 – № 3 – С.315–332.

82. Hood J.L. Association of the calpain/calpastatin network with subcellular organelles. / Hood J.L., Logan B.B., Sinai A.P., Brooks W.H., Roszman T.L. // Biochemical and biophysical research communications – 2003. – Т. 310 – № 4 – С.1200–12.

83. Hood J.L. Subcellular mobility of the calpain/calpastatin network: an organelle transient. / Hood J.L., Brooks W.H., Roszman T.L. // BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology – 2006. – Т. 28 – № 8 – С.850–9.

84. Tavares A. Demonstration of three calpains in the matrix of rat liver mitochondria. / Tavares A., Duque-Magalhàes M.C. // Biomedica biochimica acta – 1991. – Т. 50 – № 4–6 – С.523–9.

85. Joshi A. Mitochondrial micro-calpain is not involved in the processing of apoptosis-inducing factor. / Joshi A., Bondada V., Geddes J.W. // Experimental neurology – 2009. – Т. 218 – № 2 – С.221–7.

86. Cao T. Increased calpain-1 in mitochondria induces dilated heart failure in mice: role of mitochondrial superoxide anion. / Cao T., Fan S., Zheng D., Wang G., Yu Y., Chen R., Song L.-S., Fan G.-C., Zhang Z., Peng T. // Basic research in cardiology – 2019. – Т. 114 – № 3 – С.17.

87. Ozaki T. Mitochondrial m-calpain plays a role in the release of truncated apoptosis-inducing factor from the mitochondria. / Ozaki T., Yamashita T., Ishiguro S.-I. // Biochimica et biophysica acta – 2009. – Т. 1793 – № 12 – С.1848–59.

88. Shintani-Ishida K. Mitochondrial m-calpain opens the mitochondrial permeability transition pore in ischemia-reperfusion. / Shintani-Ishida K., Yoshida K.-I. // International journal of cardiology – 2015. – Т. 197 – С.26–32.

89. Ozaki T. Characteristics of mitochondrial calpains. / Ozaki T., Tomita H., Tamai M., Ishiguro S.-I. // Journal of biochemistry – 2007. – Т. 142 – № 3 – С.365–76.

90. Kar P. Submitochondrial localization of associated mu-calpain and calpastatin. / Kar P., Chakraborti T., Samanta K., Chakraborti S. // Archives of biochemistry and biophysics – 2008. – Т. 470 – № 2 – С.176–86.

91. Kosenko E. Subcellular compartmentalization of proteolytic enzymes in brain regions and the effects of chronic β-amyloid treatment. / Kosenko E., Poghosyan A., Kaminsky Y. // Brain research – 2011. – Т. 1369 – С.184–93.

92. Deshpande R. V Calpain secreted by activated human lymphoid cells degrades myelin. / Deshpande R. V, Goust J.M., Hogan E.L., Banik N.L. // Journal of neuroscience research – 1995. – Т. 42 – № 2 – С.259–65.

93. Xu L. Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. / Xu L., Deng X. // The Journal of biological chemistry – 2004. – Т. 279 – № 51 – С.53683–90.

94. Levesque S. Reactive microgliosis: extracellular micro-calpain and microglia-mediated dopaminergic neurotoxicity. / Levesque S., Wilson B., Gregoria V., Thorpe L.B., Dallas S., Polikov V.S., Hong J.-S., Block M.L. // Brain : a journal of neurology – 2010. – Т. 133 – № Pt 3 – С.808–21.

95. Fushimi K. Implication of prostaglandin E(2) in TNF-alpha-induced release of m-calpain from HCS-2/8 chondrocytes. Inhibition of m-calpain release by NSAIDs. / Fushimi K., Nakashima S., Banno Y., Akaike A., Takigawa M., Shimizu K. // Osteoarthritis and cartilage – 2004. – Т. 12 – № 11 – С.895–903.

96. Nishihara H. Matrix vesicles and media vesicles as nonclassical pathways for the secretion of m-Calpain from MC3T3-E1 cells. / Nishihara H., Nakagawa Y., Ishikawa H., Ohba M., Shimizu K., Nakamura T. // Biochemical and biophysical research communications – 2001. – Т. 285 – № 3 – С.845–53.

97. Perez J. Calpains Released by T Lymphocytes Cleave TLR2 To Control IL-17 Expression. / Perez J., Dansou B., Hervé R., Levi C., Tamouza H., Vandermeersch S., Demey-Thomas E., Haymann J.-P., Zafrani L., Klatzmann D., Boissier M.-C., Letavernier E., Baud L. // Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) – 2016. – Т. 196 – № 1 – С.168–81.

98. Fukui I. Extracellular appearance of calpain and calpastatin in the synovial fluid of the knee joint. / Fukui I., Tanaka K., Murachi T. // Biochemical and biophysical research communications – 1989. – Т. 162 – № 2 – С.559–66.

99. Mortensen A.M. Dynamic changes in the distribution of the calcium-activated neutral protease in human red blood cells following cellular insult and altered Ca2+ homeostasis. / Mortensen A.M., Novak R.F. // Toxicology and applied pharmacology – 1992. – Т. 117 – № 2 – С.180–8.

100. Laske C. Increased cerebrospinal fluid calpain activity and microparticle levels in Alzheimer’s disease. / Laske C., Stellos K., Kempter I., Stransky E., Maetzler W., Fleming I., Randriamboavonjy V. // Alzheimer’s & dementia : the journal of the Alzheimer’s Association – 2015. – Т. 11 – № 5 – С.465–74.

101. Huttenlocher A. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. / Huttenlocher A., Palecek S.P., Lu Q., Zhang W., Mellgren R.L., Lauffenburger D.A., Ginsberg M.H., Horwitz A.F. // The Journal of biological chemistry – 1997. – Т. 272 – № 52 – С.32719–22.

102. Flevaris P. A molecular switch that controls cell spreading and retraction. / Flevaris P., Stojanovic A., Gong H., Chishti A., Welch E., Du X. // The Journal of cell biology – 2007. – Т. 179 – № 3 – С.553–65.

103. Dourdin N. Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. / Dourdin N., Bhatt A.K., Dutt P., Greer P.A., Arthur J.S., Elce J.S., Huttenlocher A. // The Journal of biological chemistry – 2001. – Т. 276 – № 51 – С.48382–8.

104. Croce K. Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. / Croce K., Flaumenhaft R., Rivers M., Furie B., Furie B.C., Herman I.M., Potter D.A. // The Journal of biological chemistry – 1999. – Т. 274 – № 51 – С.36321–7.

105. Randriamboavonjy V. The role of calpain in diabetes-associated platelet hyperactivation. / Randriamboavonjy V., Fleming I. // Advances in pharmacology (San Diego, Calif.) – 2010. – Т. 59 – С.235–57.

106. Carragher N.O. Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlates with cleavage of pp125(FAK), paxillin, and talin. / Carragher N.O., Levkau B., Ross R., Raines E.W. // The Journal of cell biology – 1999. – Т. 147 – № 3 – С.619–30.

107. Farmer L.K. TRPC6 Binds to and Activates Calpain, Independent of Its Channel Activity, and Regulates Podocyte Cytoskeleton, Cell Adhesion, and Motility. / Farmer L.K., Rollason R., Whitcomb D.J., Ni L., Goodliff A., Lay A.C., Birnbaumer L., Heesom K.J., Xu S.-Z., Saleem M.A., Welsh G.I. // Journal of the American Society of Nephrology : JASN – 2019. – Т. 30 – № 10 – С.1910–1924.

108. Calle Y. Inhibition of calpain stabilises podosomes and impairs dendritic cell motility. / Calle Y., Carragher N.O., Thrasher A.J., Jones G.E. // Journal of cell science – 2006. – Т. 119 – № Pt 11 – С.2375–85.

109. Parnaud G. Inhibition of calpain blocks pancreatic beta-cell spreading and insulin secretion. / Parnaud G., Hammar E., Rouiller D.G., Bosco D. // American journal of physiology. Endocrinology and metabolism – 2005. – Т. 289 – № 2 – С.E313-21.

110. Robles E. Filopodial calcium transients regulate growth cone motility and guidance through local activation of calpain / Robles E., Huttenlocher A., Gomez T.M. // Neuron – 2003. – Т. 38 – № 4 – С.597–609.

111. Kerstein P.C. Mechanosensitive TRPC1 channels promote calpain proteolysis of talin to regulate spinal axon outgrowth. / Kerstein P.C., Jacques-Fricke B.T., Rengifo J., Mogen B.J., Williams J.C., Gottlieb P.A., Sachs F., Gomez T.M. // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience – 2013. – Т. 33 – № 1 – С.273–85.

112. Kerstein P.C. Calpain-Mediated Proteolysis of Talin and FAK Regulates Adhesion Dynamics Necessary for Axon Guidance. / Kerstein P.C., Patel K.M., Gomez T.M. // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience – 2017. – Т. 37 – № 6 – С.1568–1580.

113. Rock M.T. Beta1 integrin-mediated T cell adhesion and cell spreading are regulated by calpain. / Rock M.T., Dix A.R., Brooks W.H., Roszman T.L. // Experimental cell research – 2000. – Т. 261 – № 1 – С.260–70.

114. Trager N. The Involvement of Calpain in CD4+ T Helper Cell Bias in Multple Sclerosis. / Trager N., Butler J.T., Haque A., Ray S.K., Beeson C., Banik N.L. // Journal of clinical & cellular immunology – 2013. – Т. 4 – № 4 – С.1000153.

115. Butler J.T. Involvement of calpain in the process of Jurkat T cell chemotaxis. / Butler J.T., Samantaray S., Beeson C.C., Ray S.K., Banik N.L. // Journal of neuroscience research – 2009. – Т. 87 – № 3 – С.626–35.

116. Mikosik A. Roles of calpain-calpastatin system (CCS) in human T cell activation. / Mikosik A., Jasiulewicz A., Daca A., Henc I., Frąckowiak J.E., Ruckemann-Dziurdzińska K., Foerster J., Page A. Le, Bryl E., Fulop T., Witkowski J.M. // Oncotarget – 2016. – Т. 7 – № 47 – С.76479–76495.

117. Lokuta M.A. Calpain regulates neutrophil chemotaxis. / Lokuta M.A., Nuzzi P.A., Huttenlocher A. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2003. – Т. 100 – № 7 – С.4006–11.

118. Nuzzi P.A. Asymmetric localization of calpain 2 during neutrophil chemotaxis. / Nuzzi P.A., Senetar M.A., Huttenlocher A. // Molecular biology of the cell – 2007. – Т. 18 – № 3 – С.795–805.

119. Ishak R. Defective rapid cell shape and transendothelial migration by calpain-1 null neutrophils. / Ishak R., Hallett M.B. // Biochemical and biophysical research communications – 2018. – Т. 506 – № 4 – С.1065–1070.

120. Potter D.A. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. / Potter D.A., Tirnauer J.S., Janssen R., Croall D.E., Hughes C.N., Fiacco K.A., Mier J.W., Maki M., Herman I.M. // The Journal of cell biology – 1998. – Т. 141 – № 3 – С.647–62.

121. Perrin B.J. Proteolysis of cortactin by calpain regulates membrane protrusion during cell migration. / Perrin B.J., Amann K.J., Huttenlocher A. // Molecular biology of the cell – 2006. – Т. 17 – № 1 – С.239–50.

122. Undyala V. V The calpain small subunit regulates cell-substrate mechanical interactions during fibroblast migration. / Undyala V. V, Dembo M., Cembrola K., Perrin B.J., Huttenlocher A., Elce J.S., Greer P.A., Wang Y.-L., Beningo K.A. // Journal of cell science – 2008. – Т. 121 – № Pt 21 – С.3581–8.

123. Lane R.D. A comparison of the intracellular distribution of mu-calpain, m-calpain, and calpastatin in proliferating human A431 cells. / Lane R.D., Allan D.M., Mellgren R.L. // Experimental cell research – 1992. – Т. 203 – № 1 – С.5–16.

124. Mellgren R.L. Isolation of a Chinese hamster ovary cell clone possessing decreased mu-calpain content and a reduced proliferative growth rate. / Mellgren R.L., Lu Q., Zhang W., Lakkis M., Shaw E., Mericle M.T. // The Journal of biological chemistry – 1996. – Т. 271 – № 26 – С.15568–74.

125. Zhang W. Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone: evidence that cleavage of p53 by a calpain-like protease is necessary for G1 to S-phase transition. / Zhang W., Lu Q., Xie Z.J., Mellgren R.L. // Oncogene – 1997. – Т. 14 – № 3 – С.255–63.

126. Choi Y.H. Regulation of cyclin D1 by calpain protease. / Choi Y.H., Lee S.J., Nguyen P., Jang J.S., Lee J., Wu M.L., Takano E., Maki M., Henkart P.A., Trepel J.B. // The Journal of biological chemistry – 1997. – Т. 272 – № 45 – С.28479–84.

127. Carragher N.O. v-Src-induced modulation of the calpain-calpastatin proteolytic system regulates transformation. / Carragher N.O., Westhoff M.A., Riley D., Potter D.A., Dutt P., Elce J.S., Greer P.A., Frame M.C. // Molecular and cellular biology – 2002. – Т. 22 – № 1 – С.257–69.

128. Langenfeld J. Posttranslational regulation of cyclin D1 by retinoic acid: a chemoprevention mechanism. / Langenfeld J., Kiyokawa H., Sekula D., Boyle J., Dmitrovsky E. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 1997. – Т. 94 – № 22 – С.12070–4.

129. Joy J. Identification of calpain cleavage sites in the G1 cyclin-dependent kinase inhibitor p19(INK4d). / Joy J., Nalabothula N., Ghosh M., Popp O., Jochum M., Machleidt W., Gil-Parrado S., Holak T.A. // Biological chemistry – 2006. – Т. 387 – № 3 – С.329–35.

130. Jánossy J. Calpain as a multi-site regulator of cell cycle. / Jánossy J., Ubezio P., Apáti A., Magócsi M., Tompa P., Friedrich P. // Biochemical pharmacology – 2004. – Т. 67 – № 8 – С.1513–21.

131. Lin C.-C. Crude extract of Rheum palmatum L. Induces cell cycle arrest S phase and apoptosis through mitochondrial-dependent pathways in U-2 OS human osteosarcoma cells. / Lin C.-C., Lee M.-H., Lin J.-H., Lin M.-L., Chueh F.-S., Yu C.-C., Lin J.-P., Chou Y.-C., Hsu S.-C., Chung J.-G. // Environmental toxicology – 2016. – Т. 31 – № 8 – С.957–69.

132. Xu F. Calpain-2 Enhances Non-Small Cell Lung Cancer Progression and Chemoresistance to Paclitaxel via EGFR-pAKT Pathway. / Xu F., Gu J., Lu C., Mao W., Wang L., Zhu Q., Liu Z., Chu Y., Liu R., Ge D. // International journal of biological sciences – 2019. – Т. 15 – № 1 – С.127–137.

133. Li P. Silencing CAPN2 Expression Inhibited Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Proliferation and Invasion via AKT/mTOR Signal Pathway. / Li P., Miao C., Liang C., Shao P., Wang Z., Li J. // BioMed research international – 2017. – Т. 2017 – С.2593674.

134. Ben-Aharon I. Expression and immunolocalization of the calpain-calpastatin system in the human oocyte. / Ben-Aharon I., Ben-Yosef D., Amit A., Shalgi R. // Fertility and sterility – 2005. – Т. 83 – № 6 – С.1807–13.

135. Ben-Aharon I. Expression and possible involvement of calpain isoforms in mammalian egg activation. / Ben-Aharon I., Haim K., Shalgi R., Ben-Yosef D. // Reproduction (Cambridge, England) – 2005. – Т. 130 – № 2 – С.165–75.

136. Ben-Aharon I. The expression of calpain 1 and calpain 2 in spermatogenic cells and spermatozoa of the mouse. / Ben-Aharon I., Brown P.R., Etkovitz N., Eddy E.M., Shalgi R. // Reproduction (Cambridge, England) – 2005. – Т. 129 – № 4 – С.435–42.

137. Haim K. Expression and immunolocalization of the calpain-calpastatin system during parthenogenetic activation and fertilization in the rat egg. / Haim K., Ben-Aharon I., Shalgi R. // Reproduction (Cambridge, England) – 2006. – Т. 131 – № 1 – С.35–43.

138. Nakamura M. Replacement of m-calpain by mu-calpain during maturation of megakaryocytes and possible involvement in platelet formation. / Nakamura M., Mori M., Nakazawa S., Tange T., Hayashi M., Saito Y., Kawashima S. // Thrombosis research – 1992. – Т. 66 – № 6 – С.757–64.

139. Pintér M. Calpeptin, a calpain inhibitor, promotes neurite elongation in differentiating PC12 cells. / Pintér M., Aszódi A., Friedrich P., Ginzburg I. // Neuroscience letters – 1994. – Т. 170 – № 1 – С.91–3.

140. Liang Y.-C. Involvement of mu- and m-calpains and protein kinase C isoforms in L8 myoblast differentiation. / Liang Y.-C., Yeh J.-Y., Forsberg N.E., Ou B.-R. // The international journal of biochemistry & cell biology – 2006. – Т. 38 – № 4 – С.662–70.

141. Miyazaki T. Endothelial calpain systems orchestrate myofibroblast differentiation during wound healing. / Miyazaki T., Haraguchi S., Kim-Kaneyama J.-R., Miyazaki A. // FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology – 2019. – Т. 33 – № 2 – С.2037–2046.

142. Zhang H. Calpain-2/p35-p25/Cdk5 pathway is involved in the neuronal apoptosis induced by polybrominated diphenyl ether-153. / Zhang H., Chang L., Zhang H., Nie J., Zhang Z., Yang X., Vuong A.M., Wang Z., Chen A., Niu Q. // Toxicology letters – 2017. – Т. 277 – С.41–53.

143. Shu Y. Wnt-5a Promotes Neural Development and Differentiation by Regulating CDK5 via Ca2+/Calpain Pathway. / Shu Y., Xiang M., Zhang P., Qi G., He F., Zhang Q., Zhang Z., Lv Z., Peng X., Cai H., Tian B. // Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology – 2018. – Т. 51 – № 6 – С.2604–2615.

144. Liu Y. Calcium influx through L-type channels generates protein kinase M to induce burst firing of dopamine cells in the rat ventral tegmental area. / Liu Y., Dore J., Chen X. // The Journal of biological chemistry – 2007. – Т. 282 – № 12 – С.8594–603.

145. Oda A. pp60src is an endogenous substrate for calpain in human blood platelets. / Oda A., Druker B.J., Ariyoshi H., Smith M., Salzman E.W. // The Journal of biological chemistry – 1993. – Т. 268 – № 17 – С.12603–8.

146. Zhang Y. Protein Phosphotyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) in Calpain-dependent Feedback Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR2) in Endothelial Cells: IMPLICATIONS IN VEGF-DEPENDENT ANGIOGENESIS AND DIABETIC WOUND HEALING. / Zhang Y., Li Q., Youn J.Y., Cai H. // The Journal of biological chemistry – 2017. – Т. 292 – № 2 – С.407–416.

147. Goff E. Le Characterization of L-plastin interaction with beta integrin and its regulation by micro-calpain. / Goff E. Le, Vallentin A., Harmand P.-O., Aldrian-Herrada G., Rebière B., Roy C., Benyamin Y., Lebart M.-C. // Cytoskeleton (Hoboken, N.J.) – 2010. – Т. 67 – № 5 – С.286–96.

148. Salimi R. Blocking the Cleavage of Filamin A by Calpain Inhibitor Decreases Tumor Cell Growth. / Salimi R., Bandaru S., Devarakonda S., Gökalp S., Ala C., Alvandian A., Yener N., Akyürek L.M. // Anticancer research – 2018. – Т. 38 – № 4 – С.2079–2085.

149. Zheng X. Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response. / Zheng X., Zhou A.-X., Rouhi P., Uramoto H., Borén J., Cao Y., Pereira T., Akyürek L.M., Poellinger L. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – 2014. – Т. 111 – № 7 – С.2560–5.

150. Kulkarni S. Calpain cleaves RhoA generating a dominant-negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading. / Kulkarni S., Goll D.E., Fox J.E.B. // The Journal of biological chemistry – 2002. – Т. 277 – № 27 – С.24435–41.

151. Briz V. Activity-dependent rapid local RhoA synthesis is required for hippocampal synaptic plasticity. / Briz V., Zhu G., Wang Y., Liu Y., Avetisyan M., Bi X., Baudry M. // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience – 2015. – Т. 35 – № 5 – С.2269–82.

152. Chua B.T. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. / Chua B.T., Guo K., Li P. // The Journal of biological chemistry – 2000. – Т. 275 – № 7 – С.5131–5.

153. Blomgren K. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of “pathological apoptosis”? / Blomgren K., Zhu C., Wang X., Karlsson J.O., Leverin A.L., Bahr B.A., Mallard C., Hagberg H. // The Journal of biological chemistry – 2001. – Т. 276 – № 13 – С.10191–8.

154. Hosseini M. Calpains: Diverse Functions but Enigmatic. / Hosseini M., Najmabadi H., Kahrizi K. // Archives of Iranian medicine – 2018. – Т. 21 – № 4 – С.170–179.

155. Wang K.K. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. / Wang K.K., Posmantur R., Nadimpalli R., Nath R., Mohan P., Nixon R.A., Talanian R. V, Keegan M., Herzog L., Allen H. // Archives of biochemistry and biophysics – 1998. – Т. 356 – № 2 – С.187–96.

156. Chen Y. [Calpain-I, calpastatin, caspase-3 and apoptosis in the human left atrium in rheumatic atrial fibrillation]. / Chen Y., Wang L., Su X., Tao L., Chen X. // Zhonghua xin xue guan bing za zhi – 2006. – Т. 34 – № 4 – С.303–7.

157. Moretti D. Calpains and cancer: friends or enemies? / Moretti D., Bello B. Del, Allavena G., Maellaro E. // Archives of biochemistry and biophysics – 2014. – Т. 564 – С.26–36.

158. Łopatniuk P. Conventional calpains and programmed cell death. / Łopatniuk P., Witkowski J.M. // Acta biochimica Polonica – 2011. – Т. 58 – № 3 – С.287–96.

159. Cao X. Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. / Cao X., Deng X., May W.S. // Blood – 2003. – Т. 102 – № 7 – С.2605–14.

160. Mandic A. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. / Mandic A., Viktorsson K., Strandberg L., Heiden T., Hansson J., Linder S., Shoshan M.C. // Molecular and cellular biology – 2002. – Т. 22 – № 9 – С.3003–13.

161. Liu L. Calpain-mediated pathway dominates cisplatin-induced apoptosis in human lung adenocarcinoma cells as determined by real-time single cell analysis. / Liu L., Xing D., Chen W.R., Chen T., Pei Y., Gao X. // International journal of cancer – 2008. – Т. 122 – № 10 – С.2210–22.

162. Rami A. Synergetic effects of caspase 3 and mu-calpain in XIAP-breakdown upon focal cerebral ischemia. / Rami A., Agarwal R., Spahn A. // Neurochemical research – 2007. – Т. 32 – № 12 – С.2072–9.

163. Huang W. Decreased calpain activity in chronic myeloid leukemia impairs apoptosis by increasing survivin in myeloid progenitors and xiap1 in differentiating granulocytes. / Huang W., Bei L., Hjort E.E., Eklund E.A. // Oncotarget – 2017. – Т. 8 – № 31 – С.50629–50641.

164. Bello B. Del Cross-talk between calpain and caspase-3/-7 in cisplatin-induced apoptosis of melanoma cells: a major role of calpain inhibition in cell death protection and p53 status. / Bello B. Del, Moretti D., Gamberucci A., Maellaro E. // Oncogene – 2007. – Т. 26 – № 19 – С.2717–26.

165. Ma J.-Q. Protective effect of rutin against carbon tetrachloride-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in mouse kidney associated with the ceramide, MAPKs, p53 and calpain activities. / Ma J.-Q., Liu C.-M., Yang W. // Chemico-biological interactions – 2018. – Т. 286 – С.26–33.

166. Atencio I.A. Calpain inhibitor 1 activates p53-dependent apoptosis in tumor cell lines. / Atencio I.A., Ramachandra M., Shabram P., Demers G.W. // Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research – 2000. – Т. 11 – № 5 – С.247–53.

167. Neumar R.W. Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. / Neumar R.W., Xu Y.A., Gada H., Guttmann R.P., Siman R. // The Journal of biological chemistry – 2003. – Т. 278 – № 16 – С.14162–7.

168. Lu T. Participation of the conventional calpains in apoptosis. / Lu T., Xu Y., Mericle M.T., Mellgren R.L. // Biochimica et biophysica acta – 2002. – Т. 1590 – № 1–3 – С.16–26.

169. Baudry M. Calpain-1 and Calpain-2 in the Brain: Dr. Jekill and Mr Hyde? / Baudry M. // Current neuropharmacology – 2019. – Т. 17 – № 9 – С.823–829.

170. Cheng S.-Y. Regulatory role of calpain in neuronal death. / Cheng S.-Y., Wang S.-C., Lei M., Wang Z., Xiong K. // Neural regeneration research – 2018. – Т. 13 – № 3 – С.556–562.

171. Chemaly E.R. SERCA control of cell death and survival. / Chemaly E.R., Troncone L., Lebeche D. // Cell calcium – 2018. – Т. 69 – С.46–61.

172. Imai T. Protective effect of S-allyl-L-cysteine against endoplasmic reticulum stress-induced neuronal death is mediated by inhibition of calpain. / Imai T., Kosuge Y., Endo-Umeda K., Miyagishi H., Ishige K., Makishima M., Ito Y. // Amino acids – 2014. – Т. 46 – № 2 – С.385–93.

173. Boehmerle W. Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death. / Boehmerle W., Endres M. // Cell death & disease – 2011. – Т. 2 – С.e168.

174. Yamada K.H. Targeted gene inactivation of calpain-1 suppresses cortical degeneration due to traumatic brain injury and neuronal apoptosis induced by oxidative stress. / Yamada K.H., Kozlowski D.A., Seidl S.E., Lance S., Wieschhaus A.J., Sundivakkam P., Tiruppathi C., Chishti I., Herman I.M., Kuchay S.M., Chishti A.H. // The Journal of biological chemistry – 2012. – Т. 287 – № 16 – С.13182–93.

175. Wang Y. Differential roles for caspase-mediated and calpain-mediated cell death in 1- and 3-week-old rat cortical cultures. / Wang Y., Zyskind J.W., Colacurcio D.J., Lindl K.A., Ting J.H., Grigoriev G., Jordan-Sciutto K.L. // Neuroreport – 2012. – Т. 23 – № 18 – С.1052–8.

176. Ghavami S. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. / Ghavami S., Shojaei S., Yeganeh B., Ande S.R., Jangamreddy J.R., Mehrpour M., Christoffersson J., Chaabane W., Moghadam A.R., Kashani H.H., Hashemi M., Owji A.A., Łos M.J. // Progress in neurobiology – 2014. – Т. 112 – С.24–49.

177. Matsumori Y. Hsp70 overexpression sequesters AIF and reduces neonatal hypoxic/ischemic brain injury. / Matsumori Y., Hong S.M., Aoyama K., Fan Y., Kayama T., Sheldon R.A., Vexler Z.S., Ferriero D.M., Weinstein P.R., Liu J. // Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism – 2005. – Т. 25 – № 7 – С.899–910.

178. Zhang Q. Cdk5/p25 specific inhibitory peptide TFP5 rescues the loss of dopaminergic neurons in a sub-acute MPTP induced PD mouse model. / Zhang Q., Xie H., Ji Z., He R., Xu M., He Y., Huang J., Pan S., Hu Y. // Neuroscience letters – 2016. – Т. 632 – С.1–7.

179. Alvira D. Activation of the calpain/cdk5/p25 pathway in the girus cinguli in Parkinson’s disease. / Alvira D., Ferrer I., Gutierrez-Cuesta J., Garcia-Castro B., Pallàs M., Camins A. // Parkinsonism & related disorders – 2008. – Т. 14 – № 4 – С.309–13.

180. Miao Y. Involvement of calpain/p35-p25/Cdk5/NMDAR signaling pathway in glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat retinal neurons. / Miao Y., Dong L.-D., Chen J., Hu X.-C., Yang X.-L., Wang Z. // PloS one – 2012. – Т. 7 – № 8 – С.e42318.

181. Menzies F.M. Calpain inhibition mediates autophagy-dependent protection against polyglutamine toxicity. / Menzies F.M., Garcia-Arencibia M., Imarisio S., O’Sullivan N.C., Ricketts T., Kent B.A., Rao M. V, Lam W., Green-Thompson Z.W., Nixon R.A., Saksida L.M., Bussey T.J., O’Kane C.J., Rubinsztein D.C. // Cell death and differentiation – 2015. – Т. 22 – № 3 – С.433–44.

182. Weber J.J. A combinatorial approach to identify calpain cleavage sites in the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. / Weber J.J., Golla M., Guaitoli G., Wanichawan P., Hayer S.N., Hauser S., Krahl A.-C., Nagel M., Samer S., Aronica E., Carlson C.R., Schöls L., Riess O., Gloeckner C.J., Nguyen H.P., Hübener-Schmid J. // Brain : a journal of neurology – 2017. – Т. 140 – № 5 – С.1280–1299.

183. Russo R. Calpain-mediated cleavage of Beclin-1 and autophagy deregulation following retinal ischemic injury in vivo. / Russo R., Berliocchi L., Adornetto A., Varano G.P., Cavaliere F., Nucci C., Rotiroti D., Morrone L.A., Bagetta G., Corasaniti M.T. // Cell death & disease – 2011. – Т. 2 – С.e144.

184. Gerónimo-Olvera C. Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. / Gerónimo-Olvera C., Montiel T., Rincon-Heredia R., Castro-Obregón S., Massieu L. // Cell death & disease – 2017. – Т. 8 – № 6 – С.e2911.

185. Chung K.M. Calpain Determines the Propensity of Adult Hippocampal Neural Stem Cells to Autophagic Cell Death Following Insulin Withdrawal. / Chung K.M., Park H., Jung S., Ha S., Yoo S.-J., Woo H., Lee H.J., Kim S.W., Kim E.-K., Moon C., Yu S.-W. // Stem cells (Dayton, Ohio) – 2015. – Т. 33 – № 10 – С.3052–64.

186. Machado V.M. Involvement of calpains in adult neurogenesis: implications for stroke. / Machado V.M., Morte M.I., Carreira B.P., Azevedo M.M., Takano J., Iwata N., Saido T.C., Asmussen H., Horwitz A.R., Carvalho C.M., Araújo I.M. // Frontiers in cellular neuroscience – 2015. – Т. 9 – С.22.

187. Baritaud M. Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. / Baritaud M., Boujrad H., Lorenzo H.K., Krantic S., Susin S.A. // Cell cycle (Georgetown, Tex.) – 2010. – Т. 9 – № 16 – С.3166–73.

188. Prado Spalm F.H. Ceramide Induces the Death of Retina Photoreceptors Through Activation of Parthanatos. / Prado Spalm F.H., Vera M.S., Dibo M.J., Simón M.V., Politi L.E., Rotstein N.P. // Molecular neurobiology – 2019. – Т. 56 – № 7 – С.4760–4777.

189. Saccà E. Assessment of calpain and caspase systems activities during ageing of two bovine muscles by degradation patterns of αII spectrin and PARP-1. / Saccà E., Pizzutti N., Corazzin M., Lippe G., Piasentier E. // Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho – 2016. – Т. 87 – № 3 – С.462–6.

190. Bollino D. Valproic acid induces neuronal cell death through a novel calpain-dependent necroptosis pathway. / Bollino D., Balan I., Aurelian L. // Journal of neurochemistry – 2015. – Т. 133 – № 2 – С.174–86.

191. Amini M. Conditional disruption of calpain in the CNS alters dendrite morphology, impairs LTP, and promotes neuronal survival following injury. / Amini M., Ma C., Farazifard R., Zhu G., Zhang Y., Vanderluit J., Zoltewicz J.S., Hage F., Savitt J.M., Lagace D.C., Slack R.S., Beique J.-C., Baudry M., Greer P.A., Bergeron R., Park D.S. // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience – 2013. – Т. 33 – № 13 – С.5773–84.

192. Grammer M. Lack of phenotype for LTP and fear conditioning learning in calpain 1 knock-out mice. / Grammer M., Kuchay S., Chishti A., Baudry M. // Neurobiology of learning and memory – 2005. – Т. 84 – № 3 – С.222–7.

193. Nakajima R. Comprehensive behavioral phenotyping of calpastatin-knockout mice. / Nakajima R., Takao K., Huang S.-M., Takano J., Iwata N., Miyakawa T., Saido T.C. // Molecular brain – 2008. – Т. 1 – С.7.

194. Baudry M. Micromolar calcium stimulates proteolysis and glutamate binding in rat brain synaptic membranes. / Baudry M., Bundman M.C., Smith E.K., Lynch G.S. // Science (New York, N.Y.) – 1981. – Т. 212 – № 4497 – С.937–8.

195. Siman R. Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. / Siman R., Noszek J.C. // Neuron – 1988. – Т. 1 – № 4 – С.279–87.

196. Stasi A.M. Di Neuronal fodrin proteolysis occurs independently of excitatory amino acid-induced neurotoxicity. / Stasi A.M. Di, Gallo V., Ceccarini M., Petrucci T.C. // Neuron – 1991. – Т. 6 – № 3 – С.445–54.

197. Cerro S. del Stimulation of NMDA receptors activates calpain in cultured hippocampal slices. / Cerro S. del, Arai A., Kessler M., Bahr B.A., Vanderklish P., Rivera S., Lynch G. // Neuroscience letters – 1994. – Т. 167 – № 1–2 – С.149–52.

198. Dong Y.N. Interactions of postsynaptic density-95 and the NMDA receptor 2 subunit control calpain-mediated cleavage of the NMDA receptor. / Dong Y.N., Waxman E.A., Lynch D.R. // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience – 2004. – Т. 24 – № 49 – С.11035–45.

199. Guttmann R.P. Proteolysis of the N-methyl-d-aspartate receptor by calpain in situ. / Guttmann R.P., Sokol S., Baker D.L., Simpkins K.L., Dong Y., Lynch D.R. // The Journal of pharmacology and experimental therapeutics – 2002. – Т. 302 – № 3 – С.1023–30.

200. Yuen E.Y. Calpain regulation of AMPA receptor channels in cortical pyramidal neurons. / Yuen E.Y., Gu Z., Yan Z. // The Journal of physiology – 2007. – Т. 580 – № Pt 1 – С.241–54.

201. Vinade L. Activation of calpain may alter the postsynaptic density structure and modulate anchoring of NMDA receptors. / Vinade L., Petersen J.D., Do K., Dosemeci A., Reese T.S. // Synapse (New York, N.Y.) – 2001. – Т. 40 – № 4 – С.302–9.

202. Lu X. Proteolysis of glutamate receptor-interacting protein by calpain in rat brain: implications for synaptic plasticity. / Lu X., Wyszynski M., Sheng M., Baudry M. // Journal of neurochemistry – 2001. – Т. 77 – № 6 – С.1553–60.

203. Xu W. Calpain-mediated mGluR1alpha truncation: a key step in excitotoxicity. / Xu W., Wong T.P., Chery N., Gaertner T., Wang Y.T., Baudry M. // Neuron – 2007. – Т. 53 – № 3 – С.399–412.

204. Wang Y. Distinct roles for μ-calpain and m-calpain in synaptic NMDAR-mediated neuroprotection and extrasynaptic NMDAR-mediated neurodegeneration. / Wang Y., Briz V., Chishti A., Bi X., Baudry M. // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience – 2013. – Т. 33 – № 48 – С.18880–92.

205. Briz V. Calpains: Master Regulators of Synaptic Plasticity. / Briz V., Baudry M. // The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry – 2017. – Т. 23 – № 3 – С.221–231.

206. Baudry M. Calpain-1 and Calpain-2: The Yin and Yang of Synaptic Plasticity and Neurodegeneration. / Baudry M., Bi X. // Trends in neurosciences – 2016. – Т. 39 – № 4 – С.235–245.

207. Heysieattalab S. Impaired cerebellar plasticity and eye-blink conditioning in calpain-1 knock-out mice. / Heysieattalab S., Lee K.-H., Liu Y., Wang Y., Foy M.R., Bi X., Baudry M. // Neurobiology of learning and memory – 2019. – С.106995.

208. Ando K. Negative regulation of neurotransmitter release by calpain: a possible involvement of specific SNAP-25 cleavage. / Ando K., Kudo Y., Takahashi M. // Journal of neurochemistry – 2005. – Т. 94 – № 3 – С.651–8.

209. Gomes J.R. Cleavage of the vesicular GABA transporter under excitotoxic conditions is followed by accumulation of the truncated transporter in nonsynaptic sites. / Gomes J.R., Lobo A.C., Melo C. V, Inácio A.R., Takano J., Iwata N., Saido T.C., Almeida L.P. de, Wieloch T., Duarte C.B. // The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience – 2011. – Т. 31 – № 12 – С.4622–35.

210. Monnerie H. Glutamate alteration of glutamic acid decarboxylase (GAD) in GABAergic neurons: the role of cysteine proteases. / Monnerie H., Roux P.D. Le // Experimental neurology – 2008. – Т. 213 – № 1 – С.145–53.

211. Zakharov V. V Specific proteolysis of neuronal protein GAP-43 by calpain: characterization, regulation, and physiological role. / Zakharov V. V, Bogdanova M.N., Mosevitsky M.I. // Biochemistry. Biokhimiia – 2005. – Т. 70 – № 8 – С.897–907.

212. Holahan M.R. A Shift from a Pivotal to Supporting Role for the Growth-Associated Protein (GAP-43) in the Coordination of Axonal Structural and Functional Plasticity. / Holahan M.R. // Frontiers in cellular neuroscience – 2017. – Т. 11 – С.266.

213. Franekova V. Truncation of human dopamine transporter by protease calpain. / Franekova V., Baliova M., Jursky F. // Neurochemistry international – 2008. – Т. 52 – № 8 – С.1436–41.

214. Yurko-Mauro K.A. Dopamine-stimulated changes in activated calpain I in rat hippocampal slices. / Yurko-Mauro K.A., Friedman E. // Journal of neuroscience research – 1996. – Т. 43 – № 4 – С.476–81.

215. Rudic B. Hypothermic preservation up-regulates calpain expression and increases ubiquitination in cultured vascular endothelial cells: influence of dopamine pretreatment. / Rudic B., Song H., Breedijk A., Brinkkoetter P., Beck G., Yard B., Ponelies N. // The Journal of surgical research – 2010. – Т. 160 – № 2 – С.325–32.

216. Hassen G.W. Effects of Novel Calpain Inhibitors in Transgenic Animal Model of Parkinson’s disease/dementia with Lewy bodies. / Hassen G.W., Kesner L., Stracher A., Shulman A., Rockenstein E., Mante M., Adame A., Overk C., Rissman R.A., Masliah E. // Scientific reports – 2018. – Т. 8 – № 1 – С.18083.

217. Zhao J. Calpain inhibition reduces NMDA receptor rundown in rat substantia nigra dopamine neurons. / Zhao J., Baudry M., Jones S. // Neuropharmacology – 2018. – Т. 137 – С.221–229.

218. Deuschl G. Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Ad Hoc Scientific Committee. / Deuschl G., Bain P., Brin M. // Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society – 1998. – Т. 13 Suppl 3 – С.2–23.

219. Stacy M.A. Assessment of interrater and intrarater reliability of the Fahn-Tolosa-Marin Tremor Rating Scale in essential tremor. / Stacy M.A., Elble R.J., Ondo W.G., Wu S.-C., Hulihan J., TRS study group // Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society – 2007. – Т. 22 – № 6 – С.833–8.

220. Hughes A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson’s disease: a clinico-pathological study of 100 cases. / Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L., Lees A.J. // Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry – 1992. – Т. 55 – № 3 – С.181–4.

221. Hoehn M.M. Parkinsonism: onset, progression and mortality. / Hoehn M.M., Yahr M.D. // Neurology – 1967. – Т. 17 – № 5 – С.427–42.

222. Paxinos G.The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 6th Edition / G. Paxinos, C. Watson – Elsevier, 2007.

223. Xu J. Synaptosomes secrete and uptake functionally active microRNAs via exocytosis and endocytosis pathways. / Xu J., Chen Q., Zen K., Zhang C., Zhang Q. // Journal of neurochemistry – 2013. – Т. 124 – № 1 – С.15–25.

224. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. / Laemmli U.K. // Nature – 1970. – Т. 227 – № 5259 – С.680–5.

225. Schneider C.A. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. // Nature Methods – 2012. – Т. 9 – № 7 – С.671–675.

226. Raser K.J. Casein zymography: a method to study mu-calpain, m-calpain, and their inhibitory agents. / Raser K.J., Posner A., Wang K.K. // Archives of biochemistry and biophysics – 1995. – Т. 319 – № 1 – С.211–6.

227. Koressaar T. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. / Koressaar T., Remm M. // Bioinformatics (Oxford, England) – 2007. – Т. 23 – № 10 – С.1289–91.

228. Altschul S.F. Basic local alignment search tool. / Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // Journal of molecular biology – 1990. – Т. 215 – № 3 – С.403–10.

229. Livak K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. / Livak K.J., Schmittgen T.D. // Methods (San Diego, Calif.) – 2001. – Т. 25 – № 4 – С.402–8.

230. Коржевский Д.Э.Основы гистологической техники / Д. Э. Коржевский, А. . Гиляров – СПб: СпецЛит, 2010.– 95c.

231. Hiller K. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions / Hiller K., Grote A., Scheer M., Munch R., Jahn D. // Nucleic Acids Research – 2004. – Т. 32 – № Web Server – С.W375–W379.

232. Bendtsen J.D. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. / Bendtsen J.D., Jensen L.J., Blom N., Heijne G. Von, Brunak S. // Protein engineering, design & selection : PEDS – 2004. – Т. 17 – № 4 – С.349–56.

233. duVerle D. CaMPDB: a resource for calpain and modulatory proteolysis. / duVerle D., Takigawa I., Ono Y., Sorimachi H., Mamitsuka H. // Genome informatics. International Conference on Genome Informatics – 2010. – Т. 22 – С.202–13.

234. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. / Corpet F. // Nucleic acids research – 1988. – Т. 16 – № 22 – С.10881–90.