

ДОМИНАНТНЫЙ ЭФФЕКТ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ПРЕСЕНИЛИНА-1 В
УСИЛЕНИИ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ

*Скобелева К.В.¹, Рязанцева М.А.^{1,2}, Степанова А.В.³, Ванг Г.⁴, Яна Н.Р.⁵,
Казначеева Е.В.¹*

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Университет Хельсинки, Хельсинки, Финляндия

³ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН

⁴ Университет Сучжоу, Цзянсу, Китай

⁵ Индийский институт технологий, Харагпур, Индия

DOMINANT EFFECT OF FULL-LENGTH PRESENILIN-1 ON THE ENHANCEMENT
OF STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY

*Skobeleva K.¹, Ryazantseva M.^{1,2}, Stepanova A.³, Wang G.⁴, Jana N.R.⁵,
Kaznacheyeva E.¹*

¹ Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia

² Helsinki University, Helsinki, Finland

³ Institute of Bioorganic Chemistry, Academicians M.M. Shemyakin and Yu.A.
Ovchinnikov RAS, Moscow, Russia

⁴ Soochow University College of Pharmaceutical Sciences, Jiangsu, China

⁵ Indian Institute of Technology, Kharagpur, India

Автор для корреспонденции: Казначеева Е.В., Тихорецкий пр., д. 4., 194064, Санкт-Петербург, Россия. Тел.: +79219547925. Факс: +78122970341.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, пресенилин-1, кальциевый гомеостаз, депо-управляемый кальциевый вход.

Количество слов в основном тексте – 3579

Количество рисунков – 3

ДОМИНАНТНЫЙ ЭФФЕКТ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ПРЕСЕНИЛИНА-1 В
УСИЛЕНИИ ДЕПО-УПРАВЛЯЕМОГО ВХОДА КАЛЬЦИЯ

*Скобелева К.В.¹, Рязанцева М.А.^{1,2}, Степанова А.В.³, Ванг Г.⁴, Яна Н.Р.⁵,
Казначеева Е.В.¹*

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Университет Хельсинки, Хельсинки, Финляндия

³ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН

⁴ Университет Сучжоу, Цзянсу, Китай

⁵ Индийский институт технологий, Харагпур, Индия

Аннотация

Наследственная болезнь Альцгеймера – тяжелое нейродегенеративное заболевание, большинство случаев которого связано с мутациями в гене белка пресенилина-1 (PS1). В норме PS1 претерпевает расщепление с образованием концевых фрагментов, которые входят в состав γ -секретазного комплекса. Значительная часть мутаций в гене белка PS1 приводит к нарушению его эндопротеолиза и накоплению PS1 в полноразмерной форме. Делеция девятого экзона гена PS1, ассоциированная с болезнью Альцгеймера, приводит к утрате сайта эндопротеолиза, накоплению полноразмерной формы белка. При болезни Альцгеймера наблюдается нарушение кальциевого гомеостаза, в частности, изменение депонирования кальция и, соответственно, дисрегуляция депо-управляемого входа кальция. В данной работе показано, что PS1 с делецией девятого экзона (PS1 $\Delta E9$) и мутантный PS1 D257A, которые не подвергаются протеолитическому расщеплению, накапливались в клетках в полноразмерной форме. Накопление мутантных форм PS1 приводило к увеличению депо-управляемого входа кальция. Экспрессия концевых фрагментов PS1 не влияла на величину депо-управляемого входа кальция. Таким образом, увеличение депо-управляемого кальциевого входа в клеточных моделях наследственной модели болезни Альцгеймера связано исключительно с накоплением полноразмерного PS1 и не зависит от его γ -секретазной активности.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, пресенилин-1, кальциевый гомеостаз, депо-управляемый кальциевый вход.

Введение.

Болезнь Альцгеймера (БА) – неизлечимое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся потерей памяти и когнитивных способностей. Наследственная форма БА связана с мутациями в генах *APP*, *PSEN1* и *PSEN2* и наследуется по аутосомно-доминантному типу. Мутации в гене *PSEN1*, кодирующего белок пресенилин-1, составляют более половины всех известных мутаций, связанных с БА [1]. Трансмембранный белок пресенилин-1 (PS1) с молекулярной массой 50 кДа обладает внутримембранной протеиназной активностью и осуществляет эндопротеолитическое разрезание с образованием C-терминального фрагмента (PS1 CTF) массой 18 kDa и N-терминального фрагмента (PS1 NTF) массой 28 кДа [2]. Терминальные фрагменты PS1 составляют каталитическую субъединицу γ -секретазного комплекса, одним из субстратов которого является белок предшественник амилоида (белок APP, продукт гена *APP*). Продуктом ферментативного разрезания APP γ -секретазой является пептид бета-амилоид (A β) [3]. Амилоидные бляшки, образованные агрегатами A β , считаются патогенными образованиями, вызывающими дегенеративные процессы в мозге при их накоплении. В норме A β состоит из 40 аминокислот, но в результате нарушения одной из ступеней процесса разрезания белка APP γ -секретазой образуется удлиненная форма из 42 и более аминокислот, которая легко агрегирует и образует бляшки [4]. Причинами нарушения разрезания могут быть мутации как в гене *APP*, так и в гене каталитической субъединицы (*PSEN1* или его гомолога *PSEN2*) [4,5]. Известно, что большинство ассоциированных с БА мутаций в гене *PSEN1* приводят к снижению или потере активности γ -секретазы [6]. Клинические исследования препаратов, направленных на регуляцию количества амилоидных бляшек, не показали их положительного эффекта на когнитивные способности пациентов [7]. Одной из альтернативных гипотез о механизме патологии БА является так называемая «кальциевая гипотеза» нейродегенерации [8]. Для данной гипотезы существует немало подтверждающих данных, полученных на различных моделях БА, а также клинических данных [9–11]. Возможно, что нарушения кальциевого сигналинга в нейронах приводят к нарушениям процессов памяти [12]. Молекулами, вовлеченными в нарушение процесса вспоминания при БА, возможно являются

рианодиновый рецептор (RYR), рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP3R), фосфолипаза C и депо-управляемый кальциевый канал TRPC1 [12–14]. Ранее было продемонстрировано, что терминальные фрагменты или полноразмерный PS1 могут оказывать влияние на активность RYR или IP3R, а также кальциевой АТФазы эндоплазматического ретикулула (SERCA) [15–18]. Наши исследования показали, что изменение соотношения количества полноразмерного белка PS1 к его терминальным фрагментам в результате подавления эндопротеолиза приводит к усилению депо-управляемого входа кальция [19]. Поскольку оба RYR и IP3R играют роль в депонировании кальция в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и влияют на процесс депо-управляемого входа кальция, то вполне вероятно, что полноразмерный белок PS1 и его терминальные фрагменты могут также влиять и на регуляцию депо-управляемого входа кальция.

Материалы и методы.

Клеточные культуры. Клетки нейробластомы мыши линии Neuro2a, мышинные фибробласты и клетки почки эмбриона человека с антигеном SV40 (HEK293T) из коллекции Института цитологии РАН, а также мышинные фибробласты с двойным нокаутом PSEN1^{-/-} и PSEN2^{-/-}, полученные в дар от проф. Акселя Метнера, Германия, культивировали в среде с L-глутамином DMEM/F12 (Neuro2a) или DMEM (Биолот, Россия) с добавлением 10% телячьей сыворотки (Hyclone, США). Первичную культуру клеток гиппокампа мыши получали по описанной ранее методике [20]. Коротко, мышей линии СЗНА первого дня жизни декапитировали, извлекали мозг, помещали в охлажденный раствор для препарирования, отделяли гиппокамп. Измельченные фрагменты гиппокампа последовательно обрабатывали раствором трипсина, раствором ДНКазы I и рассеивали на обработанные полилизинном покровные стекла. Клетки первичной культуры гиппокампа культивировали в среде Neurobasal-A (Gibco, USA) с добавлением 3% телячьей сыворотки и 3% добавки B27 (Gibco, USA).

Плазмидные конструкции, кодирующие последовательности для полноразмерной экспрессии PS1 дикого типа и мутантных PS1 в векторе pcDNA3 и лентивирусном векторе FUGW, были получены в дар от проф. Безпрозванного И.Б., США. Из плазмид, кодирующих полноразмерный PS1 были получены последовательности терминальных фрагментов PS1. Праймеры для клонирования: PS1 NTF-5'CTACATATTCACCAACCACAC и PS1 NTF 3'ATGACAGAGTTACCTGCA, а также PS1 CTF-5'CTAGATATAAAAATTGATGG и

PS1 CTF-3'ATGGCAGAAGGAGACCCG. Полученные последовательности были вставлены в лентивирусный вектор FUGW.

Трансфекция и получение лентивирусных частиц. На следующий день после посева клетки Neuro2a трансфицировали с использованием трансфектина-56 (ИБХ, Россия) плазмидными конструкциями, несущими последовательности пресенилина-1 и GFP. Эксперимент проводили через два дня. Первичную культуру гиппокампа подвергали трансфекции с помощью лентивирусных частиц на 6-7 день в культуре и использовали для экспериментов на 9-10 день в культуре. Для получения лентивирусных частиц клетки HEK293T трансфицировали конструкциями с геном интереса в векторе FUGW и упаковочными конструкциями MD2.G (AddGene #12259), psPAX2 (AddGene #12260). Среду с лентивирусными частицами отбирали на второй и третий день после трансфекции, осаждали вирусные частицы (45000g) и разводили их в свежей среде. Вирусные частицы хранили при -80°C.

Иммуноокрашивание. Экспрессию пресенилина-1 и его терминальных фрагментов подтверждали стандартными методами иммунохимии с антителами к PS1 NTF и PS1 CTF (Millipore, MAB1563 и MAB5232) и антителами к HA-tag (Santa Cruz, sc-805). Равномерность загрузки различных дорожек белком проверяли с помощью антител к белку домашнего хозяйства (антитела к α -тубулину, Sigma, T6074). В качестве вторичных антител для иммуноблотинга использовали антитела, меченные пероксидазой хрена (SIGMA, A0168 и AbCam, ab102182). Пример иммуноблота с антителами к PS1 NTF и PS1 CTF представлен на рис. 1. Для иммуноокрашивания фиксированных нейронов использовали антитела Alexa Fluor 546 (Thermo Fisher Scientific, A11010). По результатам иммуноокрашивания инфицированных нейронов для дальнейшей работы выбирали титр вируса, приводящий к экспрессии целевого белка в не менее чем 90% нейронов.

Оценка изменения внутриклеточной концентрации кальция проводилась с помощью флуоресцентного зонда Fura-2. Для клеток Neuro2a использовали раствор Хенкса (HBSS: 130 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM MgCl, 10 mM HEPES, 10 mM глюкозы, 2 mM CaCl₂ pH 7.3), для культуры нейронов гиппокампа - искусственную спинномозговую жидкость (aCSF: 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl, 10 mM HEPES, 10 mM глюкозы, 2 mM CaCl₂ pH 7.3). Клетки инкубировали в HBSS или aCSF с добавлением 5 мкМ Fura-2 AM (Invitrogen, США) и 0,025% детергента pluronic (Molecular Probes, США). Через 55 минут заменяли раствор на свежий HBSS или

aCSF, эксперимент начинали через 30 минут. Стекла с клетками помещали в камеру флуориметрической установки InCyt Basic I/P dual wavelength fluorescence imaging system (Intracellular Imaging Inc., США) на базе микроскопа NikonTS100. Флуоресценцию Fura-2 возбуждали светом ксеноновой лампы, прошедшим через устройство для чередования светофильтров на 340 и 380 нм (Lambda 10-B Smartshutter). Флуоресцентный сигнал от Fura-2 попадал на светофильтр 500 нм и регистрировался цифровой камерой (CDD Pixelfly). Оцифрованное изображение обрабатывали с помощью программы «InCytIm 2». Значения соотношения флуоресценции Fura-2 вычисляли по формуле: $(F[340]/F[380])/K$, где K - коэффициент экстинкции.

Внутриклеточные кальциевые депо опустошали в бескальциевом растворе подачей 1 мкМ тапсигаргина (Tg, Sigma, США), ингибитора SERCA. Замена омывающего раствора на раствор с 2 мМ CaCl₂ приводила к развитию депо-управляемого входа Ca²⁺. Эксперименты с нейронами проводились в присутствии 0.01 мМ нифедипина и 0.01 мМ тетродотоксина, (Sigma, USA, Tocris, USA). Для статистической оценки полученных данных использовали однопараметрический дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорного критерия Тьюки. На рисунках отражены средние значения и стандартная ошибка среднего. Статистический анализ проводился с помощью программы OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, USA).

Сокращения. БА – болезнь Альцгеймера, ЭР – эндоплазматический ретикулум, Tg – тапсигаргин RYR – рианодиновый рецептор, IP3R - рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата, SERCA – кальциевая АТФаза эндоплазматического ретикулаума, PS1 WT – пресенилин-1 дикого типа, PS1 DE9 пресенилин-1 с делецией девятого экзона, PS1 D257A – пресенилин-1 с точечной мутацией, PS1 NTF и PS1 CTF - N- и C-терминальные фрагменты пресенилина-1 соответственно.

Результаты

Терминальные фрагменты PS1 не влияют на депо-управляемый вход кальция в фибробластах мыши с двойным нокаутом *PSEN1*^{-/-} и *PSEN2*^{-/-}.

В фибробластах мыши с двойным нокаутом *PSEN1*^{-/-} и *PSEN2*^{-/-} (PS DKO) полностью отсутствует возможность формирования комплекса γ -секретазы, так как отсутствует экспрессия белков компонентов её каталитического центра. Восстановление экспрессии функционального белка PS1 дикого типа (PS1 WT) в клетках PS DKO не влияло на депо-управляемый вход кальция, вызванный

пассивным опустошением кальциевых депо ЭР с помощью тапсигаргина (Tg), ингибитора SERCA. Экспрессия полноразмерного белка с аминокислотной заменой D257A (PS1 D257A), полностью предотвращающей ферментативную активность и эндопротеолиз белка PS1 [19,21], значительно увеличивала амплитуду депо-управляемого входа кальция в клетках PS DKO [19] (Рис. 2). Ранее было продемонстрировано, что N-терминальный фрагмент PS1 (PS1 NTF) оказывает влияние на открытое состояние RYR2 [15,16]. Однако, экспрессия PS1 NTF в клетках PS DKO не оказывала влияния на депо-управляемый вход кальция (Рис. 2). Экспрессия PS1 CTF в клетках PS DKO также не изменяла депо-управляемый вход кальция. Таким образом, показано влияние полноразмерного PS1 на депо-управляемый вход кальция в фибробластах мыши PS DKO.

Терминальные фрагменты PS1 не влияют на депо-управляемый вход кальция в клетках нейробластомы Neuro2a и нейронах гиппокампа мыши.

Делеция 9го экзона гена PS1 (PS1 ΔE9), вызывающая наследственную форму БА [22], приводит к потере необходимого для эндопротеолиза участка белка, снижению ферментативной активности и, как следствие, накоплению полноразмерной формы PS1 [23,24]. Экспрессия PS1 ΔE9 приводила к увеличению амплитуды депо-управляемого входа кальция, вызванного пассивным опустошением депо с помощью Tg, в клетках нейробластомы линии Neuro2a и в нейронах первичной культуры гиппокампа мыши ($137 \pm 8 \%$ и $230 \pm 9 \%$ от контрольных значений в клетках с экспрессией PS1 WT) (Рис. 3). Экспрессия белка PS1 D257A, который также не проходит эндопротеолиз, в клетках линии Neuro2a приводила к такому же эффекту увеличения амплитуды депо-управляемого входа кальция ($148 \pm 16 \%$ от контрольных значений в клетках с экспрессией PS1 WT) (Рис. 3). Известно, что RYR2 экспрессируется как в нейронах гиппокампа мыши, так и в клетках линии Neuro2a. Однако экспрессия PS1 NTF не оказывала никакого влияния на депо-управляемый вход кальция ни в нейронах гиппокампа, ни в клетках нейробластомы Neuro2a ($112 \pm 3 \%$ и $89 \pm 8 \%$ от контрольных значений соответственно). Совместная экспрессия PS1 NTF и PS1 ΔE9 в клетках нейробластомы Neuro2a вызывала увеличение депо-управляемого входа кальция ($125 \pm 8 \%$ от контрольных значений в клетках с экспрессией PS1 WT). В тоже время, этот эффект был статистически ниже, чем амплитуда входа кальция при экспрессии только PS1 ΔE9, но не более чем на 9%. В нейронах первичной культуры гиппокампа совместная

экспрессия PS1 NTF и PS1 ΔE9 также увеличивала амплитуду входа кальция по сравнению с контролем ($185 \pm 9\%$ от контрольных значений в клетках с экспрессией PS1 WT). Данный эффект в тоже время был слабее на 20%, чем в клетках с экспрессией только PS1 ΔE9.

Обсуждение

Накопление полноразмерного белка PS1 было показано в *postmortem* образцах мозга пациентов с наследственной формой БА [25]. Увеличение количества его mRNA и самого белка PS1 также были обнаружены в тканях головного мозга пациентов со спорадической формой БА [26].

Ранее было продемонстрировано, что накопление полноразмерного белка PS1 в нейронах гиппокампа мыши приводит к увеличению амплитуды депо-управляемого входа кальция [19,24]. В связи с тем, что депо-управляемый вход кальция играет важную роль в физиологии нейронов (метаболизм, высвобождение нейромедиаторов, регуляция транскрипции генов, синаптическая пластичность) [27–33], нарушения этого процесса могут привести к драматическим последствиям для мозговой активности. Например, наши исследования дают основание полагать, что патологические изменения в регуляции активности депо-управляемых каналов могут быть причиной нарушения памяти при БА [24]. Исследования других групп на животных и клеточных моделях, клинические и генетические данные пациентов с БА также находятся в соответствии с нашими данными и дополняют так называемую «кальциевую гипотезу» нейродегенерации при БА [8,9,12,25,34,35].

Ранее было продемонстрировано, что PS1 может взаимодействовать с белками, вовлеченными в регуляцию внутриклеточного кальциевого гомеостаза. Предполагается, что PS1 напрямую взаимодействует с такими белками, как RYR, IP3R, SERCA, STIM1 и оказывает влияние на их функциональную активность [15–18]. Белок PS1 проходит эндопротеолиз с образованием двух терминальных фрагментов, которые оба затем становятся каталитическим центром белкового комплекса фермента γ -секретазы. Показано, что N-терминальный фрагмент PS1 взаимодействует с RYR2 и регулирует его открытое состояние, что оказывает влияние на депонирование кальция в ЭР [15,16]. Можно полагать, что полноразмерный белок и его N-терминальный фрагмент конкурируют за общую молекулярную мишень, и что увеличение количества полноразмерного белка PS1 с одновременным снижением количества терминальных фрагментов влияет на регуляцию активности этой мишени, нарушая кальциевый гомеостаз. Экспрессия

терминальных фрагментов PS1 в нейронах гиппокампа, клетках нейробластомы Neuro2a и фибробластах PS DKO, тем не менее, не оказывала никакого эффекта на депо-управляемый вход кальция. Только полноразмерный белок PS1, который не проходит эндопротеолиз в результате мутации, оказывал влияние на амплитуду депо-управляемого входа кальция во всех трех типах клеток. В клетках линии PS DKO не экспрессируются оба гомолога *PSEN1* и *PSEN2* и, следовательно, отсутствует активная γ -секретаза. Это свидетельствует в пользу того, что экспрессия неактивного PS1 D257A в этих клетках увеличивает амплитуду депо-управляемого входа кальция независимо от активности γ -секретазы и A β . Совместная экспрессия полноразмерного PS1 и его N-терминального фрагмента также усиливает депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа и клетках Neuro2a, что говорит в пользу доминантного эффекта полноразмерного PS1. Поскольку наследственная форма БА связана с аутосомно-доминантным эффектом мутаций в *PSEN1*, то полноразмерный PS1 со сниженной ферментативной активностью, может оказывать эффект на кальциевый гомеостаз в нейронах в независимости от наличия экспрессии PS1 дикого типа.

Поддержка. Работа поддержана грантом РФФИ 17-54-80006 и программой Президиума РАН №19 «Современные проблемы высокотехнологичной медицины».

Рис. 1. Пример иммуноблота с антителами к N-терминальному (а) и С-терминальному фрагменту PS1. В белковых пробах, полученных из клеток с экспрессией мутанта ΔE9, наблюдалось накопление полноразмерной формы белка.

Рис. 2. а - Динамика изменения концентрации кальция в цитоплазме фибробластов мыши PS DKO (данные показаны как средние значения, N=20-28 от 3-6 дней экспериментов). Tg – тапсигаргин б - Диаграмма отражающая величину депо-управляемого входа Ca^{2+} , где за 100% принят депо-управляемый кальциевый вход в клетках с экспрессией PS1 WT. Данные представлены как нормированные средние значения ± стандартная ошибка среднего, N=20-28 от 3-6 дней экспериментов. * - значимое отличие на уровне $p < 0.05$ от остальных групп.

Рис. 3. а и в - Динамика изменения концентрации кальция в цитоплазме клеток нейробластомы человека Neuro2a и цитоплазме нейронов первичной культуры гиппокампа мыши соответственно (данные показаны как средние значения, N=17-40 от 3 дней экспериментов для Neuro2a и N=14-112 от 3-7 дней экспериментов для нейронов). Tg – тапсигаргин б и г - Диаграммы, отражающие величину депо-управляемого входа Ca^{2+} в клетки Neuro2a и в нейроны первичной культуры гиппокампа мыши, где за 100% принят депо-управляемый кальциевый вход в клетках с экспрессией PS1 WT. Данные представлены как нормированные средние значения ± стандартная ошибка среднего, для Neuro2a и N=14-112 от 3-7 дней экспериментов для нейронов. * - значимые различия по отношению к PS1 WT $p < 0.05$

Список цитируемой литературы.

- 1 Bekris L.M., Yu C.-E., Bird T.D., Tsuang D.W. 2010. Genetics of Alzheimer disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **23**(4): 213.
- 2 Ward R. V et al. 1996. Presenilin-1 is processed into two major cleavage products in neuronal cell lines. *Neurodegeneration.* **5**(4): 293.
- 3 Brunkan A.L., Martinez M., Walker E.S., Goate A.M. 2005. Presenilin endoproteolysis is an intramolecular cleavage. *Mol. Cell. Neurosci.* **29**(1): 65.
- 4 Bolduc D.M., Montagna D.R., Seghers M.C., Wolfe M.S., Selkoe D.J. 2016. The amyloid-beta forming tripeptide cleavage mechanism of γ -Secretase. *Elife.* .
- 5 Xu T.-H., Yan Y., Kang Y., Jiang Y., Melcher K., Xu H.E. 2016. Alzheimer's disease-associated mutations increase amyloid precursor protein resistance to γ -secretase cleavage and the A β 42/A β 40 ratio. *Cell Discov.* **2**(1): 16026.
- 6 Kim S.D., Kim J. 2008. Sequence analyses of presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Cell Stress Chaperones.* **13**(4): 401.
- 7 Makin S. 2018. The amyloid hypothesis on trial. *Nature.* **559**(7715): S4.
- 8 Khachaturian Z.S. 1994. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **747**: 1.
- 9 Lerdkrai C., Asavapanumas N., Brawek B., Kovalchuk Y., Mojtahedi N., Olmedillas del Moral M., Garaschuk O. 2018. Intracellular Ca²⁺ stores control in vivo neuronal hyperactivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**(6): E1279.
- 10 Etcheberrigaray R., Hirashima N., Nee L., Prince J., Govoni S., Racchi M., Tanzi R.E., Alkon D.L. 1998. Calcium Responses in Fibroblasts from Asymptomatic Members of Alzheimer's Disease Families. *Neurobiol. Dis.* **5**(1): 37.
- 11 Tong B.C.-K., Wu A.J., Li M., Cheung K.-H. 2018. Calcium signaling in Alzheimer's disease & therapies. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1865**(11): 1745.
- 12 Heck A. et al. 2015. Genetic analysis of association between calcium signaling and hippocampal activation, memory performance in the young and old, and risk for sporadic Alzheimer disease. *JAMA Psychiatry.* **72**(10): 1029.
- 13 Baker K.D., Edwards T.M., Rickard N.S. 2013. The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **37**(7): 1211.
- 14 González-Sánchez P., Del Arco A., Esteban J.A., Satrústegui J. 2017. Store-

- Operated Calcium Entry Is Required for mGluR-Dependent Long Term Depression in Cortical Neurons. *Front. Cell. Neurosci.* **11**: 363.
- 15 Rybalchenko V., Hwang S.-Y.Y., Rybalchenko N., Koulen P. 2008. The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity. *40*(1): 84.
 - 16 Payne A.J., Gerdes B.C., Naumchuk Y., McCalley A.E., Kaja S., Koulen P. 2013. Presenilins regulate the cellular activity of ryanodine receptors differentially through isotype-specific N-terminal cysteines. *Exp. Neurol.* **250**: 143.
 - 17 Jin H., Sanjo N., Uchihara T., Watabe K., George-Hyslop P.S., Fraser P.E., Mizusawa H. 2010. Presenilin-1 holoprotein is an interacting partner of sarco endoplasmic reticulum calcium-atpase and confers resistance to endoplasmic reticulum stress. *J. Alzheimer's Dis.* **20**(1): 261.
 - 18 Cheung K.-H., Mei L., Mak D.-O.D., Hayashi I., Iwatsubo T., Kang D.E., Foskett J.K. 2010. Gain-of-function enhancement of IP3 receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons. *Sci. Signal.* **3**(114): ra22.
 - 19 Ryazantseva M., Skobeleva K., Glushankova L., Kaznacheyeva E. 2016. Attenuated presenilin-1 endoproteolysis enhances store-operated calcium currents in neuronal cells. *J. Neurochem.* **136**(5): 1085.
 - 20 Wu J. et al. 2011. Neuronal Store-Operated Calcium Entry Pathway as a Novel Therapeutic Target for Huntington's Disease Treatment. *Chem. Biol.* **18**(6): 777.
 - 21 Kimberly W.T., Xia W., Rahmati T., Wolfe M.S., Selkoe D.J. 2000. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for gamma-secretase activity and amyloid beta-protein generation. *J. Biol. Chem.* **275**(5): 3173.
 - 22 Hiltunen M. et al. 2000. Identification of a novel 4.6-kb genomic deletion in presenilin-1 gene which results in exclusion of exon 9 in a Finnish early onset Alzheimer's disease family: an Alu core sequence-stimulated recombination? *Eur. J. Hum. Genet.* **8**(4): 259.
 - 23 Woodruff G. et al. 2013. The Presenilin-1 Δ E9 Mutation Results in Reduced γ -Secretase Activity, but Not Total Loss of PS1 Function, in Isogenic Human Stem Cells. *Cell Rep.* **5**(4): 974.
 - 24 Ryazantseva M., Goncharova A., Skobeleva K., Erokhin M., Methner A., Georgiev P., Kaznacheyeva E. 2018. Presenilin-1 Delta E9 Mutant Induces STIM1-Driven Store-Operated Calcium Channel Hyperactivation in Hippocampal Neurons. *Mol.*

- Neurobiol.* **55**(6): 4667.
- 25 Honarnejad K., Jung C.K.E., Lammich S., Arzberger T., Kretzschmar H., Herms J. 2013. Involvement of presenilin holoprotein upregulation in calcium dyshomeostasis of Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* **17**(2): 293.
- 26 Borghi R. et al. 2010. Upregulation of Presenilin 1 in Brains of Sporadic, Late-Onset Alzheimer's Disease. *J. Alzheimer's Dis.* **22**(3): 771.
- 27 Emptage N.J., Reid C.A., Fine A. 2001. Calcium Stores in Hippocampal Synaptic Boutons Mediate Short-Term Plasticity, Store-Operated Ca²⁺ Entry, and Spontaneous Transmitter Release. *Neuron.* **29**(1): 197.
- 28 Baba A., Yasui T., Fujisawa S., Yamada R.X., Yamada M.K., Nishiyama N., Matsuki N., Ikegaya Y. 2003. Activity-evoked capacitative Ca²⁺ entry: implications in synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **23**(21): 7737.
- 29 Kann O., Taubenberger N., Huchzermeyer C., Papageorgiou I.E., Benninger F., Heinemann U., Kovács R. 2012. Muscarinic receptor activation determines the effects of store-operated Ca(2+)-entry on excitability and energy metabolism in pyramidal neurons. *Cell Calcium.* **51**(1): 40.
- 30 Mitchell C.B., Gasperini R.J., Small D.H., Foa L. 2012. STIM1 is necessary for store-operated calcium entry in turning growth cones. *J. Neurochem.* **122**(6): 1155.
- 31 Shim S., Zheng J.Q., Ming G. 2013. A critical role for STIM1 in filopodial calcium entry and axon guidance. *Mol. Brain.* **6**(1): 51.
- 32 Somasundaram A., Shum A.K., McBride H.J., Kessler J.A., Feske S., Miller R.J., Prakriya M. 2014. Store-Operated CRAC Channels Regulate Gene Expression and Proliferation in Neural Progenitor Cells. *J. Neurosci.* **34**(27): 9107.
- 33 Majewski L., Kuznicki J. 2015. SOCE in neurons: Signaling or just refilling? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1853**(9): 1940.
- 34 Berridge M.J. 2014. Calcium regulation of neural rhythms, memory and Alzheimer's disease. *J. Physiol.* **592**(2): 281.
- 35 Lacampagne A. et al. 2017. Post-translational remodeling of ryanodine receptor induces calcium leak leading to Alzheimer's disease-like pathologies and cognitive deficits. *Acta Neuropathol.* **134**(5): 749.

Резюме

DOMINANT EFFECT OF FULL-LENGTH PRESENILIN-1 ON THE ENHANCEMENT OF STORE-OPERATED CALCIUM ENTRY

Most of the cases of the Alzheimer's disease are linked with mutations in presenilin-1 (PS1) gene. Normally PS1 is cleaved to terminal fragments, which comprise catalytic core of γ -secretase. Considerable portion of the mutations in PS1 gene disrupts PS1 endoproteolysis and subsequent holoprotein accumulation. One of those mutations is a deletion of 9th exon of PS1 gene. In this study we demonstrate that the PS1 holoprotein enhanced store-operated calcium (SOC) entry independently of its terminal fragments. Moreover we demonstrate that the increase in SOC entry was caused by holoprotein independently of its enzyme activity. Expressions of PS1 C- or N-terminal fragments did not have any effect on SOC entry. In the same time the N-terminal fragment co-expression with PS1 mutants was able only slightly reduce their effects on SOC due to the probable competition to same molecular target. Overall our data demonstrates that the enhance in SOC entry is caused by dominant effect of PS1 holoprotein accumulation independently of γ -secretase activity of PS1 and A β production.

Рис. 1

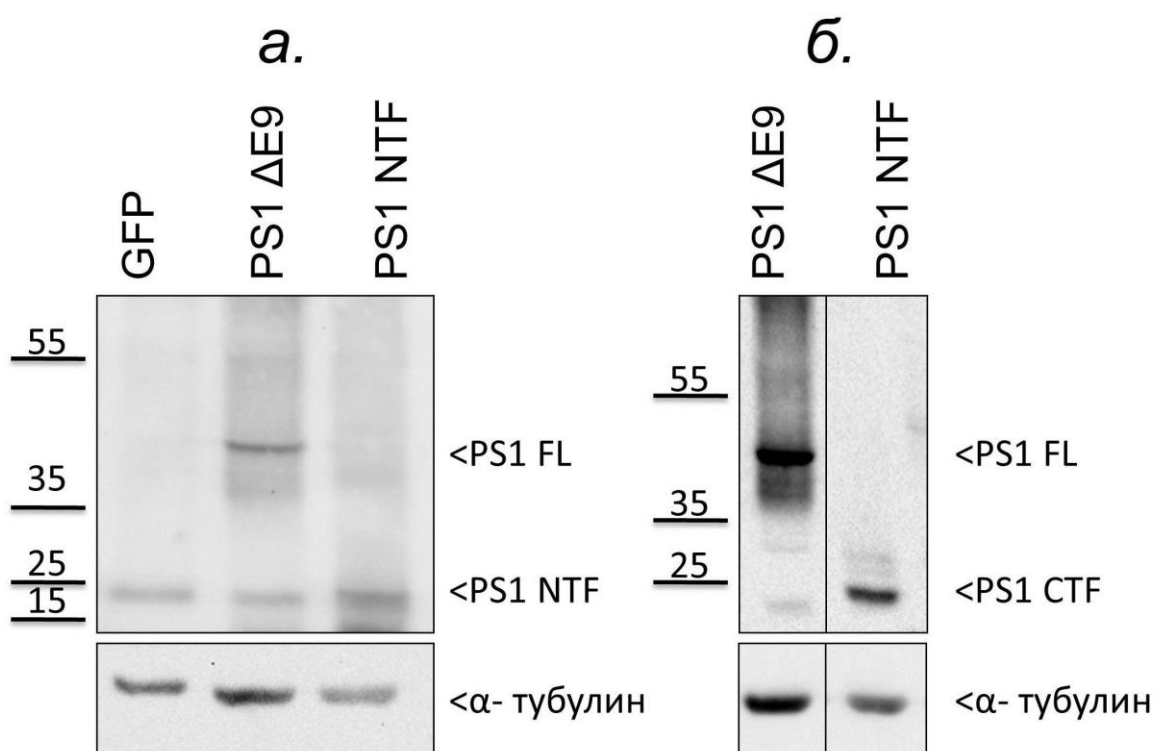


Рис. 2

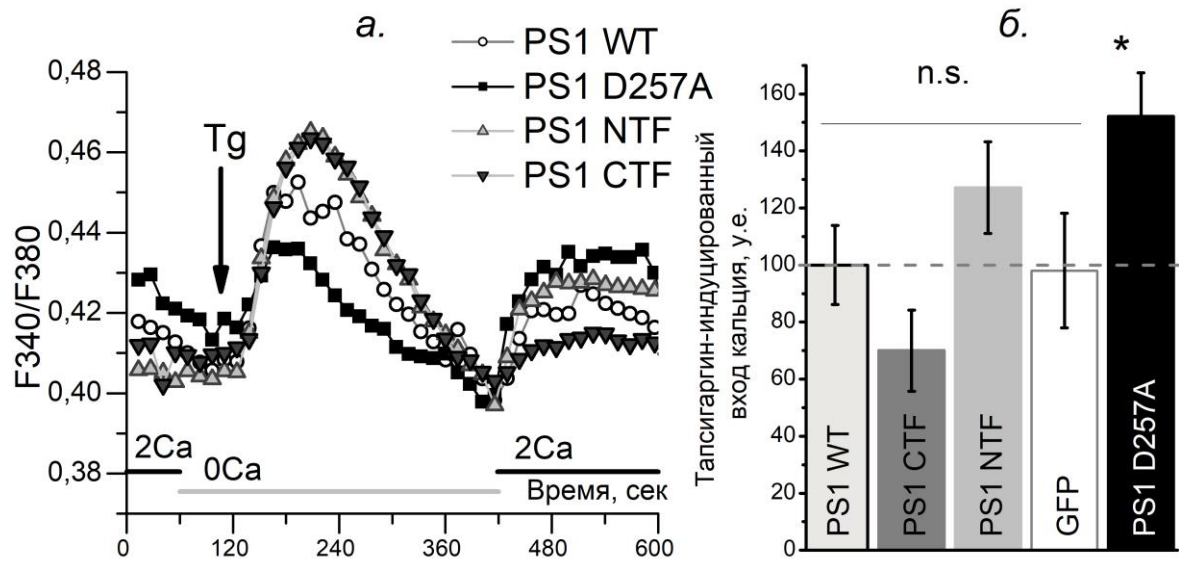


Рис. 3.

