

УДК 577.25

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

© 2019 г. К. В. Скобелева^а, М. А. Рязанцева^{а, б}, А. В. Степанова^с,
Г. Ванг^д, Н. Р. Яна^е, Е. В. Казначеева^{а, *}

^аИнститут цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4, Россия

^бУниверситет Хельсинки, 00790, Хельсинки, ул. Виикинкаари, 1, Финляндия

^сИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Россия

^дУниверситет Сучжоу, 215123, Цзянсу, ул. Рен-ай, 199, Китай

^еИндийский институт технологий, 721302, Харанпур, Индия

*e-mail: evkazn@incras.ru

Поступила в редакцию 18.02.2019 г.

После доработки 20.03.2019 г.

Принята к публикации 28.03.2019 г.

Наследственная болезнь Альцгеймера – тяжелое нейродегенеративное заболевание, большинство случаев которого связано с мутациями в гене белка пресенилина-1 (PS1). В норме PS1 расщепляется 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 полноразмерного PS1. Делеция экзона 9 гена *PS1*, ассоциированная с болезнью Альцгеймера, приводит к утрате сайта эндопротеолиза и накоплению полноразмерного белка PS1. 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 экзона 9 (PS1 DE9) и мутантный PS1 D257A, которые не подвергаются протеолитическому расщеплению, накапливаются 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 входа кальция 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 вход кальция

DOI: 10.1134/S023347551904011X

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*, кодирующем пресенилин-1, составляют более половины всех известных мута-

ций, связанных с БА [1]. Трансмембранный белок пресенилин-1 (PS1) с молекулярной массой 50 кДа является внутримембранной эндопротеазой и осуществляет саморазрезание с образованием С-концевого фрагмента (PS1 CTF) массой 18 кДа и N-концевого фрагмента (PS1 NTF) массой 28 кДа [2]. N- и С-фрагменты PS1 составляют каталитическую субъединицу γ -секретазного комплекса, одним из субстратов которого является белок-предшественник амилоида (белок APP, продукт гена *APP*). При разрезании APP γ -секретазой образуется пептид бета-амилоид (A β) [3]. Амилоидные бляшки, содержащие агрегаты A β , считаются патогенными образованиями, вызывающими дегенеративные процессы в мозге при их накоплении. В норме A β состоит из 40 аминокислотных остатков, но в результате нарушения од-

Список сокращений: БА – болезнь Альцгеймера, ЭР – эндоплазматический ретикулум, Tg – тапсигаргин, RYR – рианодинновый рецептор, IP3R – рецептор инозитол-1,4,5-трифосфата, SERCA – кальциевая АТФ-аза эндоплазматического ретикулума, PS1 WT – пресенилин-1 дикого типа, PS1 DE9 пресенилин-1 с делецией экзона 9, PS1 D257A – пресенилин-1 с точечной мутацией, PS1 NTF и PS1 CTF – N- и С-концевые фрагменты пресенилина-1 соответственно.

ной 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 выявили их положительного влияния на когнитивные способности пациентов [7]. Одной из альтернативных гипотез механизма патологии при БА считается так называемая “кальциевая гипотеза” нейродегенерации [8]. Существует немало подтверждающих эту гипотезу данных, полученных на различных моделях БА, а также клинических данных [9–11]. Возможно, что нарушения кальциевой сигнализации в нейронах приводят к нарушениям памяти [12]. В нарушение процесса воспоминания при БА вовлечены, возможно, риадиноновый рецептор (RYR), рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP3R), фосфолипаза C и депо-управляемый кальциевый канал TRPC1 [12–14]. Ранее показали, что концевые фрагменты или полноразмерный PS1 могут влиять на активность RYR или IP3R, а также кальциевой АТФ-азы эндоплазматического ретикулума (SERCA) [15–18]. Наши исследования показали, что изменение соотношения количества полноразмерного белка PS1 и его концевых фрагментов в результате подавления эндопротеолиза приводит к усилению депо-управляемого входа кальция [19]. Поскольку оба RYR и IP3R участвуют в депонировании кальция в ЭР и влияют на процесс депо-управляемого входа кальция, вполне вероятно, что полноразмерный белок PS1 и его концевые фрагменты также могут влиять и на регуляцию депо-управляемого входа кальция.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. Клетки нейробластомы мыши линии Neuro2a, фибробласты мыши и клетки почки эмбриона человека с антигеном SV40 (HEK293T) из коллекции Института цитологии РАН, а также фибробласты мыши с двойным нокаутом *PSEN1*^{-/-} и *PSEN2*^{-/-}, полученные от проф. А. 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]. Мышей линии СЗНА первого дня жизни декапитуировали, извлекали мозг, который помещали в охлажденный раствор для препарирования, отделяли гиппокамп. Измельченные фрагменты гип-

покампа последовательно обрабатывали растворами трипсина, ДНКазы I и рассеивали на покрытые полилизинном покровные стекла. Клетки первичной культуры гиппокампа культивировали в среде Neurobasal-A (Gibco, США) с добавлением 3% телячьей сыворотки и 3% добавки B27 (Gibco, США).

Плазмидные конструкции, кодирующие последовательности для полноразмерной продукции PS1 дикого типа и мутантных PS1 в векторе pcDNA3 и в лентивирусном векторе FUGW, получены от проф. Безпрозванного И.Б., США. Из плазмид, кодирующих полноразмерный PS1, получены последовательности, кодирующие концевые фрагменты PS1. Праймеры для клонирования: PS1 NTF 5'-CTACATATTCACCAACCACAC и PS1 NTF 3'-ATGACAGAGTTACCTGCA, а также PS1 CTF 5'-CTAGATATAAAATTGATGG 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 PS-1 и GFP (зеленый флуоресцентный белок). Эксперимент проводили через 2 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 (45000 g) и разводили их в свежей среде. Вирусные частицы хранили при –80°C.

Иммуноокрашивание. Экспрессию PS1 и его концевых фрагментов подтверждали стандартными иммунохимическими методами 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 иммуноблоттинга 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 не менее чем в 90% нейронов.

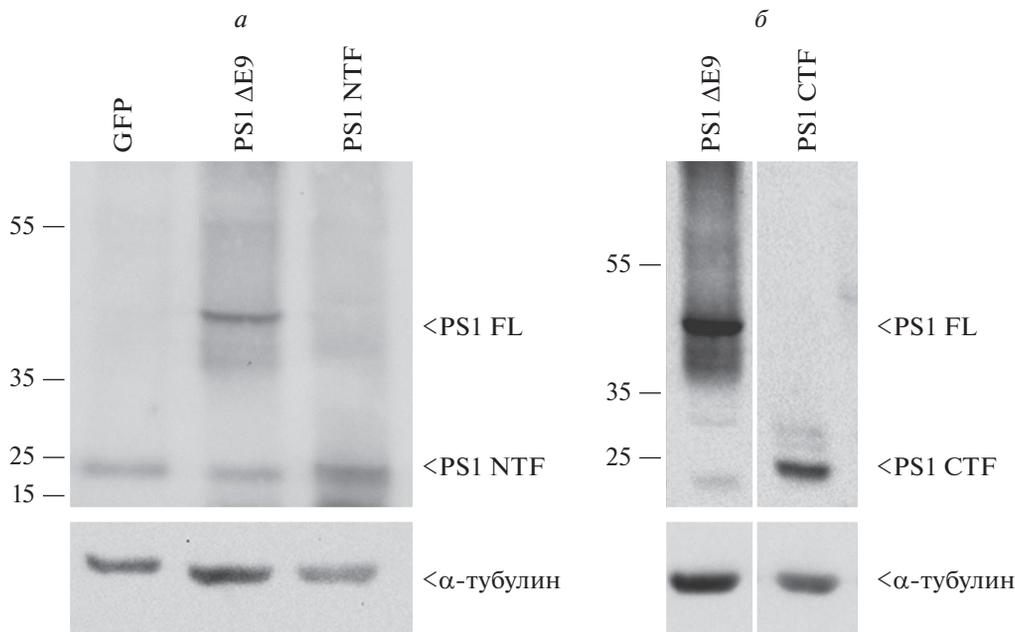


Рис. 1. Пример иммуноблота с антителами к N-концевому (а) и С-концевому (б) фрагментам PS1. В белковых пробах, полученных из клеток, экспрессирующих мутант ΔE9, наблюдалось накопление полноразмерной формы белка.

Изменения внутриклеточной концентрации кальция оценивали с помощью флуоресцентного зонда Fura-2. Для клеток Neuro2a использовали раствор Хенкса (HBSS: 130 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 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 MgCl₂, 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 мин раствор заменяли свежим HBSS или aCSF, эксперимент начинали через 30 мин. Стекла с клетками помещали в камеру флуорометрической 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 экспозиции (поправочный коэффициент, учитывающий разницу во времени экспозиции на разных длинах волн).

Внутриклеточные кальциевые депо опустошали в бескальциевом растворе подачей 1 мкМ тап-

сигаргина (Tg, Sigma, США), ингибитора SERCA. Замена омывающего раствора на раствор с 2 mM CaCl₂ приводила к развитию депо-управляемого входа Ca²⁺. Эксперименты с нейронами проводили в присутствии 0.01 mM нифедипина и 0.01 mM тетродотоксина (Sigma и Tocris, США). Для статистической оценки данных использовали однопараметрический дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорный критерий Тьюки. Статистический анализ проводили с помощью программы OriginPro 8.1 (OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концевые 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 компонентов ее 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 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 показана

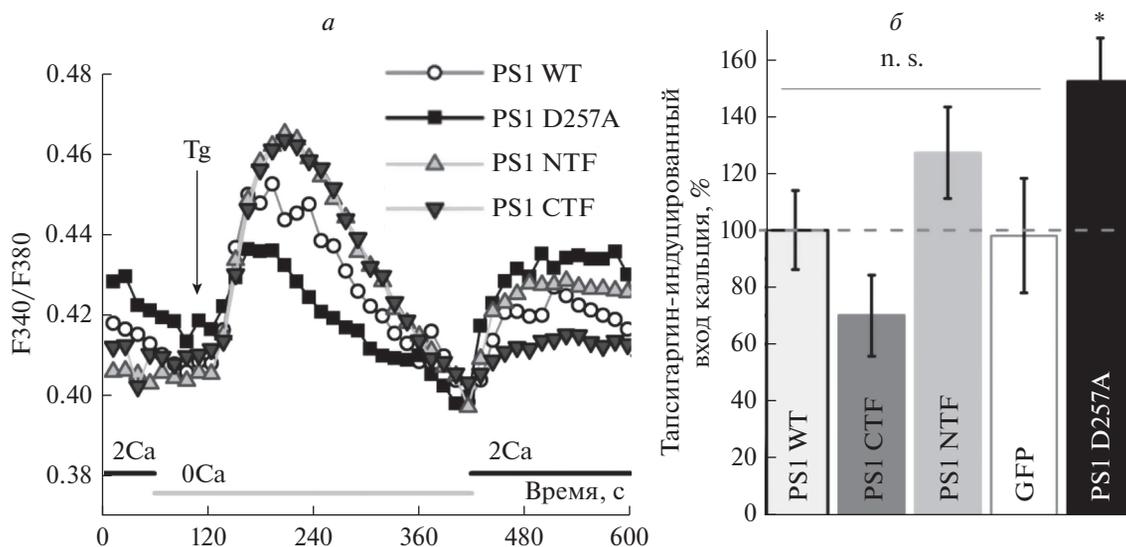


Рис. 2. *a* – Динамика изменения концентрации кальция в цитоплазме фибробластов мыши PS DKO (данные показаны как средние значения, $N = 20-28$). Tg – тапсигаргин. *б* – Диаграмма, отражающая величину депо-управляемого входа Ca^{2+} , где за 100% принят депо-управляемый кальциевый вход в клетках с экспрессией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

но, что N-концевой фрагмент PS1 (PS1 NTF) оказывает влияние на открытое состояние RYR2 [15, 16]. Однако экспрессия PS1 NTF в клетках PS DKO не влияла 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.

Концевые фрагменты PS1 не влияют на депо-управляемый вход кальция в клетках нейробластомы Neuro2a и нейронах гиппокампа мыши. Делеция экзона 9 гена *PS1* (PS1 $\Delta E9$), вызывающая наследственную форму БА [22], приводит к отсутствию необходимого для эндопротеолиза участка белка, снижению ферментативной активности и, как следствие, к накоплению полноразмерной формы PS1 [23, 24]. Экспрессия PS1 $\Delta E9$ 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 подвергается эндопротеолизу в клетках линии Neuro2a, приводила к такому же увеличению амплитуды депо-управляемого входа кальция ($148 \pm 16\%$ от значений в контрольных 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 $\Delta E9$ в клетках нейробластомы Neuro2a вызвала увеличение депо-управляемого входа кальция ($125 \pm 8\%$ от значений в контрольных клетках с экспрессией PS1 WT). В то же время, этот эффект был статистически значимо ниже, чем амплитуда входа кальция при экспрессии только PS1 $\Delta E9$, но не более, чем на 9%. В нейронах первичной культуры гиппокампа совместная экспрессия PS1 NTF и PS1 $\Delta E9$ также увеличивала амплитуду входа кальция по сравнению с контролем ($185 \pm 9\%$ от значений в контрольных клетках с экспрессией PS1 WT). Данный эффект был на 20% слабее, чем в клетках с экспрессией только PS1 $\Delta E9$.

ОБСУЖДЕНИЕ

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

Как показано ранее, накопление полноразмерного белка PS1 в нейронах гиппокампа мыши приводит к увеличению амплитуды депо-управляемого входа кальция [19, 24]. Депо-управляемый вход кальция играет важную роль в физиологии нейронов (метаболизм, высвобождение нейромедиаторов, регуляция транскрипции генов, синаптическая пластичность) [27–33], поэтому

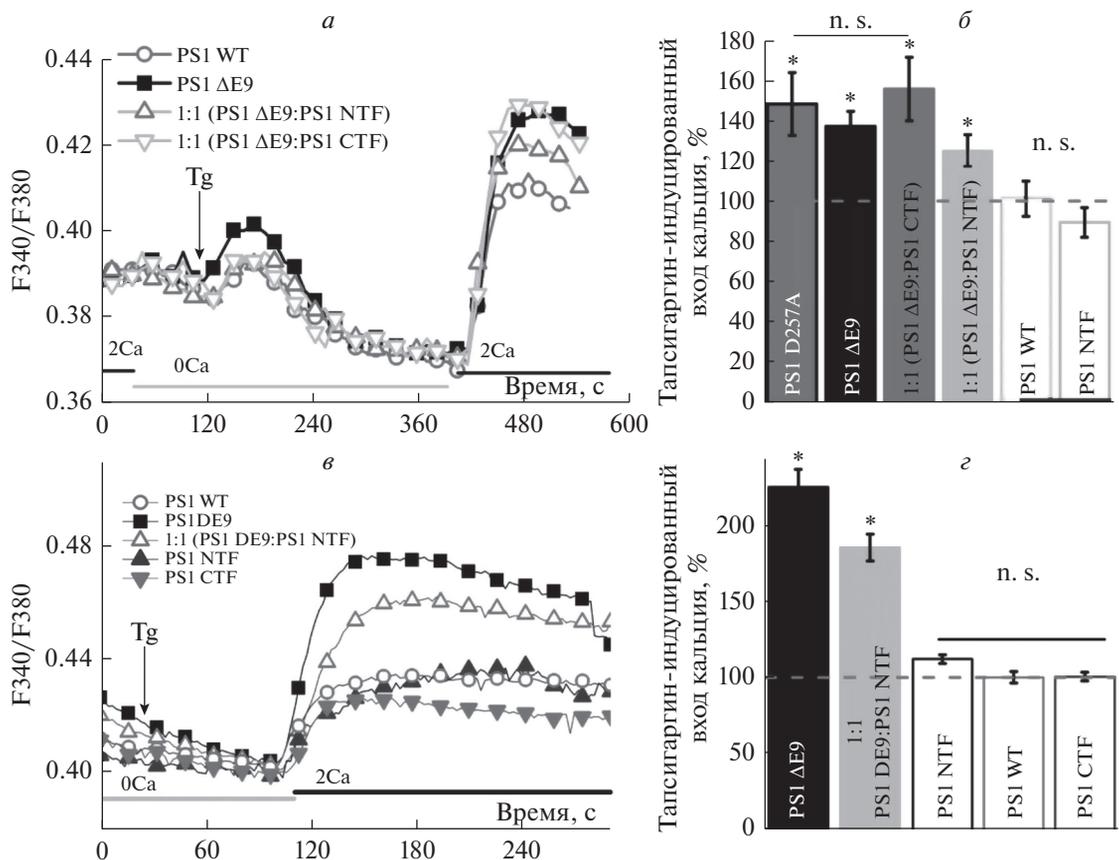


Рис. 3. *a* и *в* – Динамика изменения концентрации кальция в цитоплазме клеток нейробластомы человека Neuro2a и цитоплазме нейронов первичной культуры гиппокампа мыши соответственно (данные показаны как средние значения, $N = 17-40$ для Neuro2a и $N = 14-112$ для нейронов). Tg – тапсигаргин. *б* и *г* – 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 \pm стандартная ошибка среднего, $N = 17-40$ для Neuro2a и $N = 14-112$ для нейронов. * – значимые различия по отношению к PS1 WT $p < 0.05$.

нарушения этого процесса могут иметь драматические последствия для мозговой активности. Например, наши исследования дают основание полагать, что патологические изменения регуляции активности депо-управляемых каналов могут быть причиной нарушения памяти при БА [24]. Результаты исследований, проведенных на животных и клеточных моделях, данные клинического и генетического обследования 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 прямо взаимодействует с такими белками, как RYR, IP3R, SERCA, STIM1 и влияет на их функциональную активность [15–18]. Белок PS1 подвергается эндопротеолизу с образованием двух фрагментов –

N- и C-концевых, которые затем становятся каталитическим центром комплекса γ -секретазы. Показано, что N-концевой фрагмент PS1 взаимодействует с RYR2 и регулирует его открытое состояние, влияя таким образом на депонирование кальция в ЭР [15, 16]. Можно полагать, что полноразмерный белок и его N-концевой фрагмент конкурируют за общую молекулярную мишень, и увеличение количества полноразмерного белка PS1 с одновременным снижением количества концевых фрагментов влияет на регуляцию активности этой мишени, нарушая кальциевый гомеостаз. Экспрессия фрагментов PS1 в нейронах гиппокампа, клетках нейробластомы Neuro2a и фибробластах PS DKO не влияла, тем не менее, на депо-управляемый вход кальция. Только мутантный полноразмерный белок PS1, который не подвергается эндопротеолизу, 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, следовательно, в них 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 А β . Совместная экспрессия полно-размерного PS1 и его N-концевого фрагмента также усиливает депо-управляемый вход кальция в нейронах гиппокампа и клетках Neuro2a, что говорит в пользу доминантного эффекта полно-размерного PS1. Поскольку наследственная форма БА связана с аутосомно-доминантным эффектом мутаций в *PSEN1*, можно предположить, что полноразмерный PS1 со сниженной ферментативной активностью влияет на кальциевый гомеостаз в нейронах независимо от экспрессии PS1 дикого типа.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 17-54-80006, № 16-04-01125) и программой Президиума РАН №19 “Современные проблемы высокотехнологической медицины”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bekris L.M., Yu C.-E., Bird T.D., Tsuang D.W. 2010. Genetics of Alzheimer disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* **23** (4), 213–227.
- Ward R.V., Davis J.B., Gray C.W., Barton A.J., Bresciani L.G., Caivano M., Murphy V.F., Duff K., Hutton M., Hardy J., Roberts G.W., Karran E.H. 1996. Presenilin-1 is processed into two major cleavage products in neuronal cell lines. *Neurodegeneration.* **5** (4), 293–298.
- Brunkan A.L., Martinez M., Walker E.S., Goate A.M. 2005. Presenilin endoproteolysis is an intramolecular cleavage. *Mol. Cell. Neurosci.* **29** (1), 65–73.
- 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**: e17578.
- 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.
- Kim S.D., Kim J. 2008. Sequence analyses of presenilin mutations linked to familial Alzheimer’s disease. *Cell Stress Chaperones.* **13** (4), 401–412.
- Makin S., Yanagisawa K. 2018. The amyloid hypothesis on trial. *Nature.* **559** (7715), S4–S7.
- Khachaturian Z.S. 1994. Calcium hypothesis of Alzheimer’s disease and brain aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **747**, 1–11.
- 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–E1288.
- 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), 37–45.
- 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), 1745–1760.
- Heck A., Fastenrath M., Coynel D., Auschra B., Bickel H., Freytag V., Gschwind L., Hartmann F., Jessen F., Kaduszkiewicz H., Maier W., Milnik A., Pentzek M., Riedel-Heller S.G., Spalek K., Vogler C., Wagner M., Weyerer S., Wolfsgruber S., De Quervain D.J.-F.J.F., Papassotiropoulos A. 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), 1029–1036.
- 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), 1211–1239.
- González-Sánchez P., Del Arco A., Esteban J.A., Sastrústegui J. 2017. Store-operated calcium entry is required for mGluR-dependent long term depression in cortical neurons. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 363.
- 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. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40** (1), 84–97.
- 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**, 143–150.
- 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), 261–273.
- Cheung K.-H., Mei L., Mak D.-O.D., Hayashi I., Iwatsubo T., Kang D.E., Foscett 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.
- 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), 1085–1095.
- Wu J., Shih H.-P., Vigont V., Hrdlicka L., Diggins L., Singh C., Mahoney M., Chesworth R., Shapiro G., Zimina O., Chen X., Wu Q., Glushankova L., Ahlijanian M., Koenig G., Mozhayeva G.N., Kaznacheyeva E., Bezprozvanny I. 2011. Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington’s disease treatment. *Chem. Biol.* **18** (6), 777–793.
- 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), 3173–3178.
- Hiltunen M., Helisalmi S., Mannermaa A., Alafuzoff I., Koivisto A.M., Lehtovirta M., Pirskanen M., Sulkava R., Verkkoniemi A., Soininen H. 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), 259–266.
23. Woodruff G., Young J.E., Martinez F.J., Buen F., Gore A., Kinaga J., Li Z., Yuan S.H., Zhang K., Goldstein L.S.B. 2013. The Presenilin-1 $\Delta E9$ mutation results in reduced γ -secretase activity, but not total loss of PS1 function, in isogenic human stem cells. *Cell Rep.* **5** (4), 974–985.
 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), 4667–4680.
 25. Honarnejad K., Jung C.K.E., Lammich S., Arzberger T., Kretschmar H., Herms J. 2013. Involvement of presenilin holoprotein upregulation in calcium dyshomeostasis of Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* **17** (2), 293–302.
 26. Borghi R., Piccini A., Barini E., Cirmena G., Guglielmo M., Tamagno E., Fornaro M., Perry G., Smith M.A., Garuti A., Tabaton M. 2010. Upregulation of Presenilin 1 in brains of sporadic, late-onset Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **22** (3), 771–775.
 27. Emptage N.J., Reid C.A., Fine A. 2001. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca^{2+} entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron.* **29** (1), 197–208.
 28. Baba A., Yasui T., Fujisawa S., Yamada R.X., Yamada M.K., Nishiyama N., Matsuki N., Ikegaya Y. 2003. Activity-evoked capacitative Ca^{2+} entry: implications in synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **23** (21), 7737–7741.
 29. Kann O., Taubenberger N., Huchzermeyer C., Papa-georgiou 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), 40–50.
 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), 1155–1166.
 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., Kesler 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), 9107–9123.
 33. Majewski L., Kuznicki J. 2015. SOCE in neurons: Signaling or just refilling? *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* **1853** (9), 1940–1952.
 34. Berridge M.J. 2014. Calcium regulation of neural rhythms, memory and Alzheimer's disease. *J. Physiol.* **592** (2), 281–293.
 35. Lacampagne A., Liu X., Reiken S., Bussiere R., Meli A.C., Lauritzen I., Teich A.F., Zalk R., Saint N., Arancio O., Bauer C., Duprat F., Briggs C.A., Chakroborty S., Stutzmann G.E., Shelanski M.L., Checler F., Chami M., Marks A.R. 2017. Post-translational remodeling of ryanodine receptor induces calcium leak leading to Alzheimer's disease-like pathologies and cognitive deficits. *Acta Neuropathol.* **134** (5), 749–767.

Dominant Effect of Full-Length Presenilin-1 on the Enhancement of Store-Operated Calcium Entry

K. V. Skobeleva¹, M. A. Ryazantseva^{1,2}, A. V. Stepanova³, G. Wang⁴, N. R. Jana⁵, E. V. Kaznacheyeva^{1,*}

¹*Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Tikhoretskii pr. 4, St.-Petersburg, 194064 Russia*

²*Helsinki University, Helsinki, 00790 Finland*

³*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117198 Russia*

⁴*Soochow University College of Pharmaceutical Sciences, Jiangsu, 215123 China*

⁵*Indian Institute of Technology, Kharagpur, 721302 India*

*e-mail: evkazn@incras.ru

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 the 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 the PS1 C- or N-terminal fragments did not have any effect on SOC entry. At the same time, the N-terminal fragment co-expression with PS1 mutants was able to reduce their effects on SOC only slightly, due to the probable competition for the same molecular target. Overall, our data demonstrate that an increase in the SOC entry is caused by a dominant effect of the PS1 holoprotein accumulation independently of γ -secretase activity of PS1 and $A\beta$ production.

Keywords: Alzheimer's disease, presenilin-1, calcium homeostasis, store-operated calcium entry