

РОЛЬ РЕДОКС-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ В РЕАЛИЗАЦИИ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОК

УДК 577.24

НЕЙРОНАЛЬНЫЙ КАЛЬЦИЕВЫЙ СЕНСОР-1: ЦИНК/РЕДОКСЗАВИСИМЫЙ БЕЛОК СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

© 2023 г. В. Е. Бакшеева^a, А. А. Замятнин мл.^{a, b, c, d}, Е. Ю. Зерний^{a, *}

^aНаучно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

^bФакультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия

^cНаучный центр трансляционной медицины, Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования “Научно-технологический университет “Сириус”, федеральная территория “Сириус”, пгт. Сириус, Краснодарский край, 354340 Россия

^dИнститут молекулярной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*e-mail: zerni@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 17.04.2023 г.

После доработки 08.06.2023 г.

Принята к публикации 21.06.2023 г.

Ключевые аспекты функционирования нервной системы управляются с участием сигналов внутриклеточного кальция. Контроль возбудимости и пластичности нейронов при участии ионов кальция лежит в основе механизмов высшей нервной деятельности, а механизмы этого контроля представляют особый интерес для исследователей. В настоящее время описано семейство высокоспециализированных нейрональных белков, которые способны трансформировать информацию, содержащуюся в сигналах кальция, в регуляцию каналов, ферментов, рецепторов и факторов транскрипции. К наиболее ярким представителям этого семейства относится нейрональный кальциевый сенсор-1 (neuronal calcium sensor-1, NCS-1), который интенсивно экспрессируется в клетках центральной нервной системы (ЦНС) и контролирует такие жизненно важные процессы, как рост и выживаемость нейронов, рецепцию, нейротрансмиссию и синаптическую пластичность. Недавно обнаружено, что помимо ионов кальция NCS-1 может связывать так называемый “мобильный”, или сигнальный, внутриклеточный цинк, рост концентрации которого – характерная особенность клеток в состоянии окислительного стресса. Координация цинка в этих условиях стимулирует окисление NCS-1 с образованием дисульфидного димера (dNCS-1), обладающего измененными функциональными свойствами. Совокупное действие мобильного цинка и повышенного редокс-потенциала среды может таким образом индуцировать aberrантную активность NCS-1, включающую сигналы на выживание нервных клеток или индукцию их гибели и, как следствие, развитие нейродегенеративных процессов. В обзоре подробно рассмотрены вопросы локализации, регуляции экспрессии, структуры и молекулярных свойств NCS-1, а также современные данные по его сигнальной активности в норме и при патологии, в том числе в рамках каскадов цинкзависимой редокс-регуляции.

Ключевые слова: нейроны, сигналы кальция, нейрональные кальциевые сенсоры, нейрональный кальциевый сенсор-1, цинк, окислительный стресс, редокс-регуляция, нейродегенеративные заболевания

DOI: 10.31857/S0026898423060022, **EDN:** SLBNIV

Сокращения. НКС – нейрональные кальциевые сенсоры; ЦНС – центральная нервная система; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; BDNF (brain-derived neurotrophic factor) – нейротрофический фактор мозга; CA (cornu ammonis) neurons – пирамидальные нейроны Аммонова рога (гиппокампа); CAPS (Calcium-dependent secretion activator 1) – Ca²⁺-зависимый активатор секреции; D2R (dopamine receptor 2) – рецептор-2 дофамина; EF(1–4) – EF-hand мотив 1–4; GCAP (guanylate cyclase-activating proteins) – белки-активаторы гуанилатциклаза; GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) – глиальный нейротрофический фактор; GPCR (G-protein-coupled receptor) – рецептор, сопряженный с G-белком; GRK (G-protein-coupled receptor kinase) – протеинкиназа рецепторов, сопряженных с G-белками; IL1RAPL1 (interleukin-1 receptor accessory protein-like 1) – гомолог-1 ко-рецептора интерлейкина-1; InsP₃R (inositol triphosphate receptor) – рецепторы инозитолтрифосфата; IP₃ (inositol triphosphate) – инозитолтрифосфат; KChIP (K⁺-channel interacting proteins) – белки, взаимодействующие с K⁺-каналами; LTD (long-term depression) – долговременная депрессия; LTP (long-term potentiation) – долговременная потенциация; NCS-1 (neuronal calcium sensor-1) – нейрональный кальциевый сенсор-1; PI(4,5)P₂ (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; PI3P (phosphatidylinositol-3-phosphate) – фосфатидилинозитол-3-фосфат; PI4P (phosphatidylinositol-4-phosphate) – фосфатидилинозитол-4-фосфат; PI5P – (phosphatidylinositol-5-phosphate) фосфатидилинозитол-5-фосфат; PI4Kβ (phosphatidylinositol-4-kinase β) – фосфатидилинозитол-4-киназа-β; Pik1 (phosphatidylinositol-4-kinase-1) – дрожжевая фосфатидилинозитол-4-киназа-1; PLC (phospholipase C) – фосфолипаза C; STD (short-term depression) – кратковременная депрессия; STP (short-term potentiation) – кратковременная потенциация; VILIP (visinin-like proteins) – визининподобные белки.

ВВЕДЕНИЕ

Ключевые аспекты развития, функционирования и гибели клеток нервной системы регулируются за счет сигнальной активности ионов кальция. Особый интерес для исследования представляет контроль возбудимости и пластичности нейронов при участии ионов кальция, лежащий в основе механизмов высшей нервной деятельности. После открытия роли циклических нуклеотидов и связанных с ними сигнальных путей было высказано предположение, что Ca^{2+} может также функционировать как вторичный мессенджер в нейронах. Некоторое время спустя были идентифицированы первичные Ca^{2+} -сенсоры в цепи стимул \rightarrow ответ, которые трансформируют информацию, содержащуюся в изменениях уровня ионов кальция, в регуляцию каналов, ферментов, рецепторов и факторов транскрипции. За последние 30 лет было открыто большое семейство таких Ca^{2+} -сенсоров, ярким представителем которых является нейрональный кальциевый сенсор-1 (neuronal calcium sensor-1, NCS-1). Впервые NCS-1 был охарактеризован как белок *Drosophila melanogaster*, кодируемый геном, локализующимся в так называемом *Shaker*-локусе X-хромосомы [1]. Ранее показано, что мутации в этом локусе у мух фенотипа V7 связаны с дисфункцией потенциалзависимых K^+ -каналов, которая выражается в чрезмерной возбудимости мотонейронов и приводит к судорогам. Поскольку активность K^+ -каналов у V7 подавлялась лишь частично, было высказано предположение, что в этом фенотипе затронут не сам ионный канал, а связанный с ним ранее неизвестный регуляторный белок. В результате секвенирования соответствующего участка хромосомы была получена последовательность нового гена. При анализе продукта его трансляции длиной 187 а.о. выявили наличие четырех Ca^{2+} -связывающих мотивов типа EF-hand, гомологичных таковым у кальмодулина [2]. Методом гибридизации *in situ* проанализирован паттерн экспрессии нового белка в нервной системе дрозофилы и выявлена его локализация в синаптических окончаниях. Выяснилось также, что у фенотипа V7 разрыв хромосомы вблизи сигнала полиаденилирования обнаруженного гена способствует 4-кратному увеличению его экспрессии [3]. Примечательно, что характерный для V7 “взрывной” выброс нейромедиатора запускается стимуляцией моторных нейронов в определенном диапазоне частот (>5 Гц). Такой же эффект наблюдали у генетически модифицированных животных с избыточной экспрессией нового белка. В связи с этим свойством последнему было присвоено название “фреквенин” (от англ. “frequency”).

Не осталось незамеченным сходство фреквенина с универсальным Ca^{2+} -сенсором — кальмодулином — и открытыми на тот момент реверери-

ном и визининподобным белком (visinin-like protein-1, VILIP-1). Фреквенин, реверерин и VILIP-1 специфичны для нервной ткани, содержат четыре Ca^{2+} -связывающих мотива EF-hand и N-концевой сигнал миристоилирования — ацилирования остатком 14-звенной насыщенной жирной (миристиновой) кислоты. На основании этого сходства указанные белки были отнесены к новому семейству примембранных белков, отвечающих за регуляцию чувствительности различных типов нейронов к внешним стимулам в ответ на сигналы Ca^{2+} . Это семейство получило название “нейрональные кальциевые сенсоры” (НКС) [4]. Открытый впоследствии ортолог фреквенина (72% идентичности) из нервной системы курицы (*Gallus gallus*) получил название NCS-1. Кроме того, были охарактеризованы гомологи NCS-1 лягушки (*Xenopus laevis*), крысы (*Rattus norvegicus*), мыши (*Mus musculus*), человека (*Homo sapiens*), рыбы данио-рерио (*Danio rerio*), речного рака (*Procambarus clarkii*), морского зайца (*Aplysia californica*), нематоды (*Caenorhabditis elegans*), пекарских (*Saccharomyces cerevisiae*) и делящихся (*Schizosaccharomyces pombe*) дрожжей и т.д. [5–14]. Ca^{2+} -связывающие белки, обладающие сходной структурной организацией, были открыты в растениях и получили название SCaBP (SOS3-like calcium-binding protein, Ca^{2+} -связывающие белки из группы SOS3, где SOS3 — первый открытый белок этого семейства) [15, 16]. Примечательно, что близкородственные фреквенину/NCS-1 белки встречаются и у одноклеточных организмов. В целом, наблюдаемая степень консервативности NCS-1 (60% идентичности для белков человека и дрожжей) может указывать, во-первых, на близкое родство этого белка с общим предком семейства НКС, а во-вторых, на фундаментальность его функции. Действительно, при экспрессии в дрожжевых клетках NCS-1 млекопитающих может частично заменять собой фреквенин [17]. Ортологи NCS-1 известны под множеством разных названий: для дрозофилы, лягушки, ракообразных используется название “фреквенин”, для дрожжей — Frq1, для человека, курицы и нематоды — NCS-1, для моллюска морского зайца — апликальцин и т.д.

В представленном обзоре основной фокус сделан на белке позвоночных животных, в связи с чем здесь и далее будет использован термин “NCS-1” (даже если оригинальное наименование в литературе отличается — как в случае фреквенина лягушки).

СТРУКТУРА ГЕНА
И ИЗОФОРМНЫЙ СОСТАВ NCS-1

Ген NCS-1 человека (*NCSI*) расположен на хромосоме-9 в локусе 9q34.1, имеет длину около

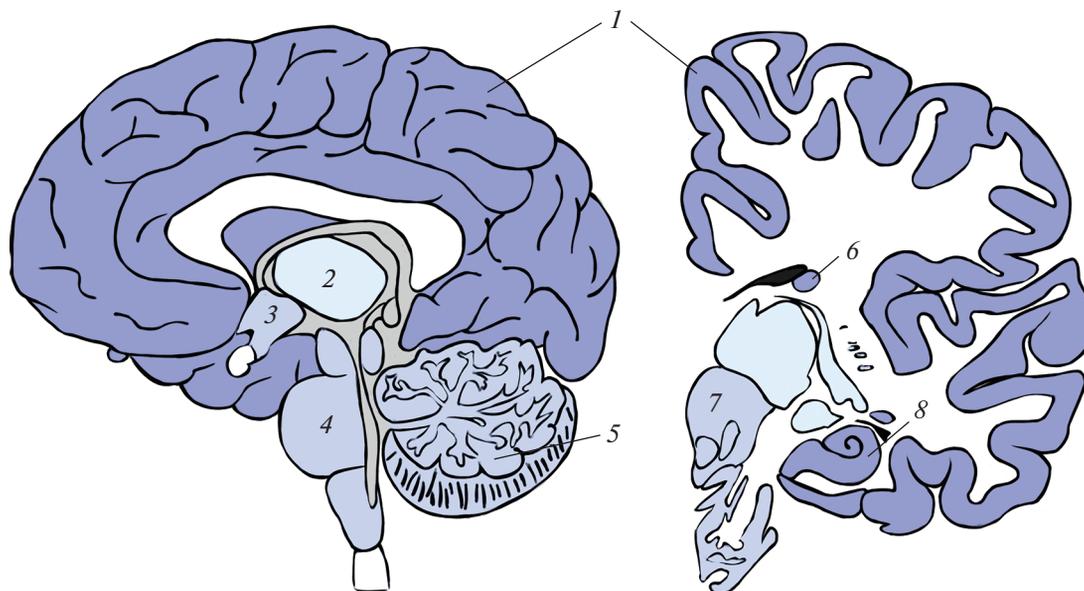


Рис. 1. Экспрессия NCS-1 в мозге человека (по данным Human Protein Atlas). 1 – кора головного мозга, 2 – таламус, 3 – гипоталамус, 4 – мост, 5 – мозжечок, 6 – базальные ядра, 7 – средний мозг, 8 – гиппокамп. Области с более высоким содержанием NCS-1 выделены более темным цветом.

64 т.п.н. и содержит 8 экзонов и 7 интронов [18]. Кодированные последовательности составляют менее 1% его длины. Некодирующие области гена *NCS1* обладают крайне низкой консервативностью, за исключением нескольких участков двух первых интронов. Механизмы регуляции транскрипции *NCS1* млекопитающих остаются невыясненными. Показано, что у человека промоторная область гена *NCS1* расположена на отрезке длиной 2 т.п.н. перед старт-кодоном и что ингибирование фосфорилирования неизвестного фактора транскрипции протеинкиназой GSK3B повышает экспрессию *NCS1* [19]. В промоторной области *NCS1* также обнаружен сайт связывания субъединицы RelA-p65 комплекса NF-κB [20]. Противоопухолевые микроРНК: miR-144-5p и miR-144-3p – связываются в некодировющей 3'-концевой области мРНК NCS-1 и подавляют синтез белка [21]. В мозге крысы экспрессия NCS-1 регулируется микроРНК, ассоциированными с ангиогенезом и синаптогенезом [22].

Анализ транскриптома человека выявил наличие двух альтернативных мРНК NCS-1: первая соответствует белку (190 а.о.), идентичному другим NCS-1 млекопитающих, в то время как вторая кодирует вариант NCS-1, у которого первые 22 остатка полипептидной цепи, включающие в себя сигнал миристилирования и первую α-спираль белка, заменены на последовательность из 4 аминокислот – MATI [23]. Эта укороченная изоформа NCS-1 (172 а.о.) представляет собой продукт альтернативного сплайсинга: последовательность ДНК, соответствующая 5'-концевому

участку укороченной мРНК, расположена внутри интрона-1 гена *NCS1*. Соответствующая мРНК NCS-1 действительно была обнаружена в клеточных линиях человека, но ее содержание на 3 порядка ниже, чем полноразмерной мРНК, а экспрессию соответствующего ей белкового продукта детектировать не удалось [24]. Изоформа NCS-1^{MATI} отличается от основной изоформы белка по Ca²⁺-связывающим свойствам: она связывает на один Ca²⁺ меньше и обладает примерно на 2 порядка более низким сродством к ионам кальция. Несмотря на это, при экспрессии рекомбинантного NCS-1 в клетках SHSY5Y различия в жизнеспособности клеток, преимущественно экспрессирующих первую или вторую изоформы белка, не наблюдается. Таким образом, скорее всего, в живых клетках преобладает классический миристилированный вариант белка NCS-1 длиной 190 а.о.

КЛЕТочНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ NCS-1

По сравнению с другими белками семейства НКС, многие из которых встречаются исключительно или преимущественно в сетчатке или гиппокампе, NCS-1 достаточно широко распространен в нейронах центральной нервной системы (ЦНС) [25]. Больше всего NCS-1 содержится в отделах мозга, отвечающих за процессы обработки информации, обучения, памяти и контроля эмоций: коре больших полушарий, таламусе, миндалевидном теле, гиппокампе и мозжечке (рис. 1). У человека содержание NCS-1 в нейронах коры в несколько раз превышает его экспрессию в дру-

гих отделах мозга, что отражает важность белка для когнитивной функции [7]. Внутриклеточная концентрация NCS-1 в нейронах при этом составляет от 0.5 до 5 мкМ и может сильно варьировать даже внутри одной популяции нейронов [26].

Наиболее подробно локализация NCS-1 в нервной системе изучена у грызунов. Изначально было обнаружено выраженное окрашивание антителами против NCS-1 пирамидальных нейронов гиппокампа и аксональных кисточек корзинчатых нейронов мозжечка, а также узелки таламуса [26, 27]. Дальнейшие исследования выявили высокое содержание белка в миелинизированных аксонах мозолистого тела, внутренней капсулы, передней спайки, пирамидной системы, а также белого вещества мозжечка [28]. Окрашивание также наблюдали в телах и дендритах нейронов коры мозга, базальных ядер (ганглиев) переднего мозга, обонятельных луковиц, зубчатой извилины гиппокампа, среднего мозга, варолиева моста, продолговатого мозга, коры и глубоких ядер мозжечка, ствола мозга [28]. На уровне мРНК экспрессия *NCS1* зарегистрирована в гранулярных и митральных клетках обонятельных луковиц, передних обонятельных ядрах, пирамидном слое обонятельной коры, во всех слоях коры кроме слоя I (самого наружного), в перегородке между боковыми желудочками мозга, базальных ядрах, хвостатом ядре и прилежащем ядре, отделах CA1–CA3 (пирамидальные нейроны) и зубчатой извилине (гранулярные нейроны) гиппокампа, узелке и ядрах таламуса, ядрах гипоталамуса, верхнем и нижнем двухолмиях среднего мозга, глубинных ядрах мозжечка, а также стволе мозга [6, 29]. Во внутреннем ухе NCS-1 локализуется в пре- и постсинаптических нервных окончаниях вестибулярного аппарата и кортиева органа [30]. В обонятельных нейронах NCS-1 ассоциирован с цитоскелетом в отростках (нейритах) и синапсах [31]. Экспрессия NCS-1 также наблюдается в клетках глии: незрелых астроцитах гиппокампа и бергмановских глиальных клетках мозжечка [6]. NCS-1 содержится в радиально ориентированных астроцитах, которые отвечают за передачу сигналов между разными структурами спинного мозга в процессе его развития [32]. За пределами ЦНС NCS-1 преимущественно локализуется в нервно-мышечных окончаниях и мышечных веретенах – рецепторах, которые направляют в нервную систему информацию о скорости сокращения и длине мышц, а также в энтеральной нервной системе кишечника [33–35]. В коже NCS-1 сконцентрирован в нервных окончаниях вблизи кровеносных сосудов [36]. В целом, на нервную ткань приходится более 60% от общей экспрессии NCS-1 [25]. Остальная часть белка экспрессируется в сердце и в небольших количествах в почках, кишечнике и предстательной железе [7].

Внутри клеток основная доля NCS-1 содержится в мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и аппарата Гольджи и небольшая часть – в растворимой фракции цитоплазмы [37]. В телах нейронов коры, гиппокампа и мозжечка NCS-1 сосредоточен в приядерной области, на поверхности мембранных цистерн комплекса Гольджи, наиболее удаленных от ядра (так называемых транс-Гольджи) [28]. В клетках мозга NCS-1 преобладает в постсинаптических окончаниях по сравнению с пресинаптическими окончаниями – исключение составляют богатые NCS-1 окончания аксонов мшистых ядер мозжечка. В аксонах NCS-1 колокализуется с нейрофиламентами, микротрубочками и ЭПР. Особенно много NCS-1 вблизи перехватов Ранвье [36]. NCS-1 не входит в состав синапсом, хотя колокализуется с белками SV2 и синаптофизинном – маркерами синаптических пузырьков [28]. NCS-1, как правило, отсутствует в ядре, однако небольшое количество этого белка присутствует в ядрах кардиомиоцитов [38].

ФУНКЦИЯ NCS-1 В НОРМЕ

Фенотипы, делеционные по *NCS1*, характеризуются многочисленными дефектами развития, что отражает широкое разнообразие функций кодируемого этим геном белка. Примерно треть мышей с фенотипом *Ncs1*^{-/-} погибает вскоре после рождения, а особи, доживающие до взрослого возраста, склонны к ожирению и диабету II типа [39, 40]. У животных с делецией *Ncs1* также нарушена когнитивная функция: у таких мышей отмечают тревожное поведение и намного менее охотное исследование новой среды [41–43]. Действительно, NCS-1 обладает набором из более чем 20 различных регуляторных мишеней: рецепторов, ионных каналов, ферментов и не только – и задействован во множестве внутриклеточных сигнальных путей. Он принимает участие в регуляции нейротрансмиссии, рецепции, роста и развития нейрональных отростков, а также секреции, синтеза фосфоинозитидов, гомеостаза Ca²⁺, клеточной мобильности и выживания в условиях стресса. Один из важнейших аспектов функциональной активности NCS-1 – регуляция процессов синаптической пластичности, лежащих в основе механизмов высшей нервной деятельности.

Регуляция синаптической пластичности

Синаптическая пластичность представляет собой изменение силы и чувствительности синапса в ответ на определенную последовательность стимулов и обеспечивается его морфологической и функциональной перестройкой. Эти явления играют ключевую роль при формировании нейрон-

ных связей в ходе роста и развития организма, а также в рамках механизмов обучения и памяти. К основным типам синаптической пластичности относятся следующие: кратковременная потенциация (short-term potentiation, STP), кратковременная депрессия (short-term depression, STD), долговременная потенциация (long-term potentiation, LTP) и долговременная депрессия (long-term depression, LTD) (для обзора см. [44]). NCS-1 вовлечен сразу в несколько этих процессов. Хотя этот белок присутствует в головном мозге повсеместно, наиболее богаты им нейроны различных отделов гиппокампа. Особенно много NCS-1 в мшистых волокнах — пучках немиелинизированных аксонов, которые передают информацию из зубчатой извилины в отдел гиппокампа СА3 [45]. Зубчатая извилина гиппокампа — одна из немногих структур мозга, где возможен нейрогенез во взрослом организме. Благодаря этому свойству, зубчатая извилина является основной зоной пластичности во взрослом мозге [46]. При LTP, индуцированной *N*-метил-*D*-аспаратом (*N*-methyl-*D*-aspartate, NMDA), в гиппокампе крысы экспрессия NCS-1 в нейронах зубчатой извилины заметно повышается [47]. В свою очередь, избыток NCS-1 снижает пороговое значение стимуляции, необходимое для запуска LTP, которое лежит в основе механизмов обработки информации в гиппокампе, позволяющих мозгу распознавать элементы окружения и отличать “новое” от “знакомого” [48, 49]. В гиппокампальных нейронах СА1–СА3, отвечающих в том числе за пространственную память, NCS-1 индуцирует STP [50]. За счет этой регуляции NCS-1 может способствовать “пробуждению” синапсов, которые прежде находились в неактивном состоянии [51]. Кроме того, NCS-1 непосредственно задействован в регуляции глутаматзависимой LTD, которая развивается в ответ на активацию метаболитных рецепторов глутамата, регулирующих в этом числе экспрессию NCS-1 [52, 53]. Показано, что для развития глутаматзависимой LTD в нейронах гиппокампа необходимо взаимодействие NCS-1 с Ca^{2+} -связывающим белком PICK1 (protein interacting with C kinase-1). Предполагается, что активация глутаматных рецепторов приводит к локальному высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных депо, что позволяет NCS-1 Ca^{2+} -зависимым образом связывать PICK1. В свою очередь, PICK1 индуцирует фосфорилирование и интернализацию ионотропных рецепторов глутаматного типа, AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole proionic acid), и таким образом способствует развитию LTD [54]. Примечательно, что альтернативный, или NMDA-зависимый, путь развития LTD не требует наличия NCS-1 [52]. Наконец, NCS-1 может принимать участие в регуляции LTD и в нейронах мозжечка. Кора мозжечка разделена на продольные компартменты (кластеры),

и механизмы двигательного обучения связаны в том числе с Ca^{2+} -зависимой индукцией LTD между нейронами, принадлежащими к разным кластерам [55]. NCS-1 входит в число белков, уровень экспрессии которых значительно отличается между соседними кластерами, и, таким образом, рассматривается как возможный участник этих механизмов [56].

Благодаря способности выступать в роли регулятора синаптической пластичности, NCS-1 принимает непосредственное участие в механизмах обучения и памяти. Так, у мышей селективное увеличение экспрессии NCS-1 в зубчатой извилине гиппокампа повышает склонность к исследованию и способствует улучшению краткосрочной и долгосрочной пространственной памяти [48]. У животных дикого типа исследование новой среды и регулярная физическая активность стимулируют увеличение уровня NCS-1 в гиппокампе [42, 57]. Недостаток NCS-1, напротив, подавляет интерес к исследованию, мотивированность, ухудшает пространственную память, провоцирует тревожность и депрессивное состояние [41–43, 58].

Регуляция нейрогенеза

В связи с тем, что экспрессия NCS-1 значительно выше в развивающемся мозге, чем в зрелом, было сделано предположение о его особой роли в процессах роста и дифференцировки нейронов [59]. Действительно, у млекопитающих NCS-1 считается одним из самых ранних маркеров нервных клеток [30]. Паттерн экспрессии NCS-1 в нервно-мышечных окончаниях, спинном мозге, сердце, а также слуховой, обонятельной и зрительной системах значительно меняется в ходе их развития и часто коррелирует с такими процессами, как рост аксонов и синаптогенез [30–33, 59–61]. Примечательно, что в зрелом организме NCS-1, напротив, подавляет рост и ветвление нейритов [62]. Вероятно, это связано с тем, что после созревания нейронов запускаются механизмы, ограничивающие их рост и регенерацию, и NCS-1 может быть в них задействован. В нейроэндокринных клетках, которые способны приобретать черты нейронов под действием фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF), подавление активности NCS-1 повышает эффективность роста нейритов [63]. Однако при полной инактивации NCS-1 в нервных окончаниях спинальных ганглиев рост нейритов полностью прекращается [63]. По-видимому, NCS-1 оказывает комплексное воздействие на морфологию нейронных отростков за счет регуляции гомеостаза Ca^{2+} , в результате чего и избыток, и критический недостаток этого белка приводят к серьезным нарушениям структуры и функции нейронов.

Регуляция секреции

Одним из первых открытых свойств NCS-1 была его способность заметно ускорять время отклика моторных нейронов на стимул [12]. Было высказано предположение, что NCS-1 является регулятором экзоцитоза и, таким образом, напрямую воздействует на скорость выброса нейромедиатора. Действительно, в нейроэндокринных клетках надпочечников, где механизмы секреции во многом аналогичны нейрональным, NCS-1 колокализуется с секреторными гранулами и стимулирует выброс их содержимого в ответ на возбуждение пуринергических и гистаминовых рецепторов [64–66]. NCS-1 также стимулирует секрецию адренортикотропного гормона клетками таламуса, повышая число образуемых клеткой секреторных пузырьков [67]. В спинном мозге NCS-1 преимущественно локализуется в клетках, секретирующих нейропептид CGRP, и, возможно, участвует в регуляции этого процесса [36].

Примечательно, что в интактных нейроэндокринных клетках избыточная экспрессия NCS-1 влияет только на агонистзависимую секрецию [68]. По-видимому, воздействие NCS-1 на механизм секреции происходит не напрямую, а при участии белков-посредников. Непосредственно запуск экзоцитоза под действием NCS-1 может происходить за счет высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных резервуаров [65]; при этом сам белок может выступать в роли активатора секреции за счет Ca^{2+} -зависимой регуляции фосфатидилинозитол-4-киназы- β (PI4K β), катализирующей синтез фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (phosphatidyl inositol-4,5-bisphosphate, PI(4,5)P₂) [13, 65, 69, 70]. Действительно, NCS-1 колокализуется и взаимодействует с PI4K β в ряде клеточных линий [65, 69–73]. Более того, наличие функционально активной формы PI4K β необходимо для формирования гранулярных структур в приядерной области, на поверхности которых накапливается NCS-1 [72]. В нейроэндокринных клетках Ca^{2+} -связанный NCS-1 способствует мембранной ассоциации PI4K β в ответ на возбуждение пуринергических рецепторов клетки [37, 74]. Именно на примере нейроэндокринных клеток наиболее подробно изучена регуляция экзоцитоза под действием NCS-1/PI4K β и предложена модель (рис. 2), которая подтверждена многочисленными экспериментальными данными [37, 64, 74–76]. Согласно этой модели, NCS-1 способствует более эффективному высвобождению внутриклеточного Ca^{2+} при стимуляции клеток молекулами агониста (например, АТФ или брадикинина). Это происходит за счет активации PI4K β и повышения уровня фосфоинозитидов PI4P (phosphatidyl inositol-4-phosphate) и PI(4,5)P₂. Последний относится к субстратам фосфолипазы C (PLC) и основным источникам сигнальной молекулы инози-

толтрифосфата (IP₃). Связываясь с рецепторами на поверхности ЭПР, IP₃ запускает высвобождение внутриклеточных запасов Ca^{2+} , что, в свою очередь, стимулирует секрецию. В клетках с избыточной экспрессией NCS-1 увеличен запас субстрата для PLC и, следовательно, повышен уровень сигнала при воздействии агониста.

Взаимодействие NCS-1 с PI4K β в нервных клетках менее изучено, хотя качественно образование комплекса между этими белками показано методом коиммунопреципитации [37]. У крыс NCS-1 и PI4K β совместно локализируются в дендритах нейронов спинального ганглия, а также в телах и дендритах нейронов гиппокампа [37, 77]. Кроме того, NCS-1 при посредничестве PI4K β стимулирует синтез PI4P и регулирует выброс нейромедиаторов норэпинефрина и глутамата из нервных окончаний [78]. В отсутствие NCS-1 в нейронах гиппокампа мышей снижается уровень фактора роста BDNF и число секреторных гранул, содержащих BDNF и дофамин [58]. Добавим, что регуляция секреции под действием NCS-1 может опосредоваться не только PI4K β . В синаптических окончаниях нейронов воздействие антител против NCS-1 нарушает Ca^{2+} -зависимую секрецию норэпинефрина, но не глутамата [78]. Это может быть связано с различным строением и белковым составом регулируемых NCS-1 секреторных комплексов, содержащих эти нейромедиаторы. Например, в состав норэпинефриновых секреторных гранул входит еще один Ca^{2+} -чувствительный белок – CAPS, который также может быть задействован в NCS-1-зависимой сигнализации. Так, в β -клетках поджелудочной железы антитела против CAPS полностью блокируют эффект NCS-1 на секрецию инсулина [69]. Помимо CAPS выявлен ряд других потенциальных участников NCS-1/PI4K β -зависимой регуляции секреции: кальневрон-1, белки-адаптеры клатрина AP1 и AP2, синаптобrevин-2, белки группы ARF и APOL3 [79–83]. Кальневрон-1 конкурирует с NCS-1 за связывание с PI4K β при снижении уровня кальция до <400 нМ и ингибирует активность фермента, тем самым предотвращая спонтанную активацию комплекса NCS-1/PI4K β [80]. Аполипротеин APOL3 связывается с Ca^{2+} -заполненным NCS-1 и способствует образованию комплекса NCS-1/PI4K β [79]. NCS-1 колокализуется со всеми белками ARF и Ca^{2+} -зависимым образом связывает ARF1 – доказанный сигнальный партнер PI4K β [84]. По отдельности и NCS-1, и ARF1 стимулируют активность PI4K β , однако в присутствии NCS-1 эффективность ARF1 как активатора фермента значительно снижается. Более того, при совместной экспрессии в нейроэндокринных клетках ARF1 препятствует активации секреции под действием NCS-1. По-видимому, NCS-1 и PI4K β могут конкурировать за связыва-

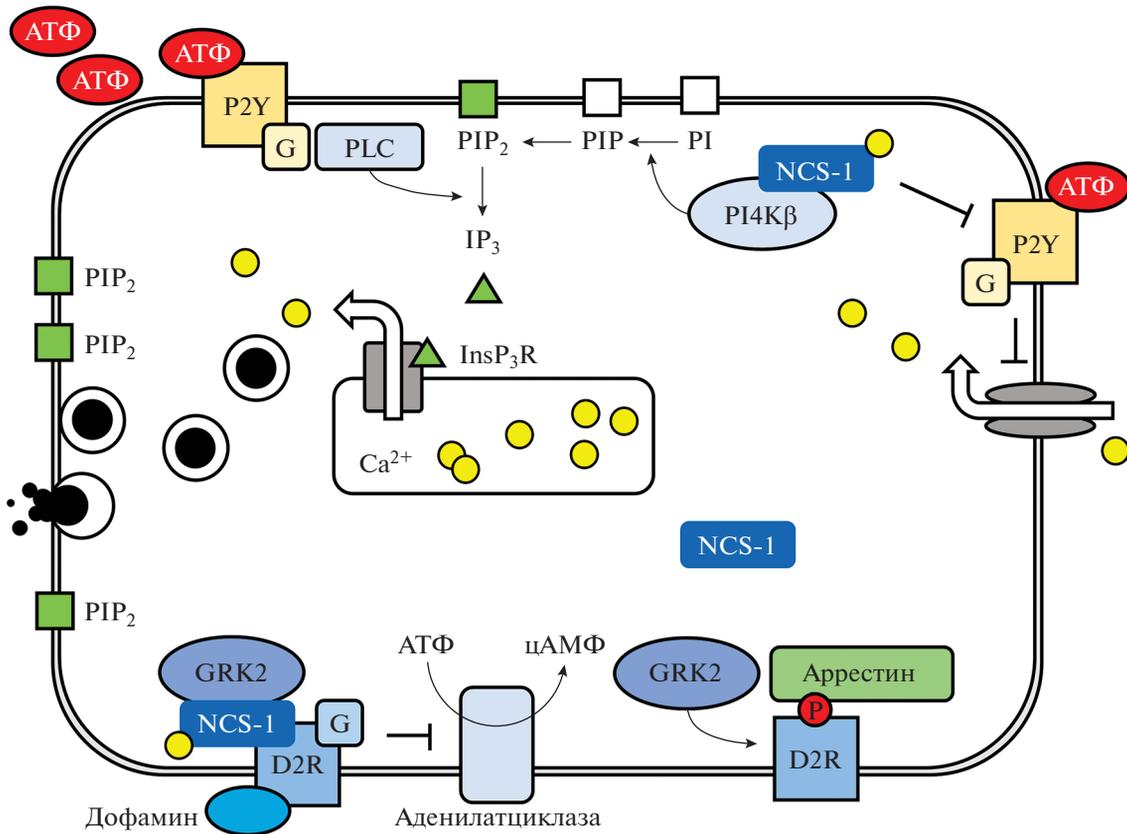


Рис. 2. Примеры внутриклеточной регуляторной активности NCS-1. NCS-1 выполняет регуляцию секреции, Ca²⁺-зависимым образом стимулируя фосфорилирование фосфатидинозитола (PI) и накопление в мембранах фосфатидинозитол-4,5-бисфосфата (PIP₂). При связывании АТФ с пуриnergическими рецепторами (P2Y) происходит активация фосфолипазы C (PLC), которая способствует образованию из PIP₂ сигнальной молекулы инозитолтрифосфата (IP₃). Связываясь с рецепторами (inositol triphosphate receptors, InsP₃R) на поверхности ЭПР, IP₃ запускает высвобождение Ca²⁺ из внутриклеточных резервуаров. При повышении внутриклеточного Ca²⁺ возрастает мобильность секреторных везикул и их склонность к слиянию с плазматической мембраной и выбросу содержимого. Одновременно NCS-1 выступает в роли регулятора сигнальных каскадов GPCR (G-protein-coupled receptor). В присутствии Ca²⁺ NCS-1 образует тройной комплекс с рецептором дофамина (D2R) и сопряженной с ним протеинкиназой GRK2, предотвращая фосфорилирование рецептора, его связывание с аррестином, инактивацию и впоследствии интернализацию. В свою очередь, D2R ингибирует аденилатциклазу и тем самым блокирует ряд цАМФ-зависимых сигнальных путей в нейронах.

ние с ARF1. Таким образом, становится невозможной одновременная активация фермента обоими регуляторными белками и может достигаться дифференцировка сигнальных путей, запускаемых различными стимулами.

Регуляция рецепторов, сопряженных с G-белками

Белок NCS-1 был идентифицирован в качестве регулятора дофаминовой сигнализации [85]. Дофаминовый путь играет ключевую роль в управлении памятью, вниманием и системой вознаграждения, а его нарушения связаны с рядом психоневрологических расстройств, таких как шизофрения, биполярное расстройство и болезнь Паркинсона. Семейство дофаминовых рецепторов относится к сопряженным с G-белками (G-protein coupled receptor, GPCR) и включает пять трансмембранных рецепторов (D1–D5). В сигнальные

комплексы с этими рецепторами входят белки из группы DRIP (dopamine receptor-interacting proteins), среди которых идентифицировано несколько регуляторных Ca²⁺-связывающих белков [86]. В ранних работах методом дрожжевого скрининга было выявлено взаимодействие NCS1-1 с C-концевым участком рецепторов D2, D3 и D5 [85]. Способность NCS-1 связываться с рецептором D2 (D2R) подтвердили и методом аффинного соосаждения. Затем на клеточной модели было продемонстрировано, что избыток NCS-1 препятствует агонистзависимой интернализации D2R. NCS-1 также нивелирует эффект избыточной экспрессии протеинкиназ GRK2 и GRK3, которые фосфорилируют D2R и D3R, на интернализацию этих рецепторов (рис. 2). В присутствии ионов Ca²⁺ NCS-1 коиммунопреципитирует с D2R и GRK2 из клеточных лизатов, что предполагает образование этими белками тройного

комплекса. Замечено, что NCS-1 взаимодействует с киназой GRK2 и в отсутствие рецептора и теоретически может регулировать ее активность в отношении как D2R, так и других рецепторов – субстратов этого фермента [87]. В некоторых отделах мозга D2R образует гетеродимеры с аденозиновыми рецепторами A_{2A}R [88]. Такой гетеродимер может функционировать как агонистзависимый активатор или ингибитор аденилатциклазы – в зависимости от сочетания доступных агонистов или присутствия дополнительных регуляторных белков. Показано, что в нейронах полосатого тела NCS-1 и еще один Ca²⁺-связывающий белок – кальневрон-1 – конкурируют за связывание с гетеродимером D2R/A_{2A}R при разных концентрациях внутриклеточного Ca²⁺. В этом случае Ca²⁺-NCS-1 предотвращает аллостерическое ингибирование D2R на фоне активации A_{2A}R и способствует снижению уровня цАМФ, в то время как кальневрон-1 связывается с гетеродимером при большом избытке Ca²⁺ и блокирует оба рецептора [89].

Белок NCS-1 также колокализуется с D2R в синаптических окончаниях нейронов префронтальной коры головного мозга – области высокой пластичности, тесно связанной с когнитивной функцией, – поэтому их взаимодействие может играть важнейшую роль в процессах высшей нервной деятельности [90]. Действительно, влияние NCS-1 на механизмы обучения и памяти связано с его участием в дофаминергической сигнализации [48]. Ингибирование взаимодействия между NCS-1 и D2R в нейронах зубчатой извилины гиппокампа при помощи минимального пептида D2R, способного связываться с NCS-1, приводит к снижению уровня экспрессии дофаминового рецептора в мембранах гиппокампальных нейронов, подавлению NCS-1-индуцированной синаптической пластичности и снижению когнитивной функции у экспериментальных животных. В отсутствие NCS-1 также снижен уровень дофаминергической активности в нейронах прилежащего ядра головного мозга, участвующих в системе вознаграждения и мотивации [41].

Семейство белков GPCR характеризуется сходством структуры и некоторыми общими механизмами активации/десенситизации. В связи с этим логично ожидать, что, помимо дофаминовых рецепторов фреквенин/NCS-1 может связывать и другие мишени среди белков этого семейства. Например, в нейроэндокринных клетках, содержащих избыток NCS-1, усилен ответ на стимуляцию мускариновых рецепторов [91]. NCS-1 и кальневрон-1 конкурируют за связывание с рецептором каннабиоидов CB₁R в нейронах полосатого тела [92]. Кроме гетеродимеров с D2R NCS-1 связывает гомодимеры A_{2A}R и участвует в Ca²⁺-зависимой регуляции связанных с ним процес-

сов: фосфорилировании протеинкиназ ERK1/ERK2 и АКТ [93].

Как уже упоминалось, NCS-1 обладает способностью регулировать протеинкиназы из семейства GRK [87]. Известно, что на 7 генов, кодирующих белки семейства GRK в геноме человека, приходится более 800 генов GPCR, поэтому каждый белок GRK участвует во множестве сигнальных путей, причем не только за счет ферментативной активности [94]. Следовательно, через регуляцию протеинкиназ GRK NCS-1 может не только регулировать десенситизацию самых разных GPCR, но и участвовать в других сигнальных процессах. Необходимо добавить, что NCS-1 стимулирует синтез PI(4,5)P₂ – фактора мембранной ассоциации и непосредственного активатора ряда GRK [75, 95]. Таким образом, образование комплекса NCS-1 с указанными ферментами совсем не обязательное условие для их регуляции под действием этого Ca²⁺-сенсорного белка, которая может осуществляться им опосредовано [95].

Регуляция ионных каналов

В мозге позвоночных NCS-1 колокализуется с калиевыми каналами А-типа, которыми богаты тела и дендриты нейронов гиппокампа и гранулярных клеток мозжечка [96]. В присутствии Ca²⁺ NCS-1 способствует активации K⁺-каналов, содержащих субъединицы Kv4.2 и Kv4.3, усиливая ток ионов и замедляя их инактивацию [97]. В клеточной модели NCS-1 активирует K⁺-каналы несколько менее эффективно, чем их доказанный регулятор KChIP2 – гомологичный белок из подсемейства НКС, члены которого взаимодействуют с K⁺-каналами (K⁺-channel interacting proteins, KChIPs) [98]. Предполагается, что NCS-1 регулирует внутриклеточный транспорт K⁺-каналов из прищелочной области на плазматическую мембрану нейронов. В нейронах симпатической нервной системы NCS-1 снижает эффективность брадикининзависимого закрытия K⁺-каналов М-типа [99, 100]. Вероятно, это происходит за счет активации синтеза PI(4,5)P₂, который необходим для поддержания этих каналов в открытой конформации. NCS-1 участвует в регуляции K⁺-каналов не только в нейронах, но и в клетках в сердечной мышце. В эмбриональных кардиомиоцитах обнаружена колокализация NCS-1 с Kv4.2, в то время как экспрессия белков KChIP достигает максимума только после рождения [59]. NCS-1 также коиммунопреципитирует с Kv4.3 из лизата миокарда мыши [98]. Хотя в кардиомиоцитах Kv4.3 регулируется KChIP2, последний практически отсутствует в волокнах Пуркинье, которые образуют в сердце специализированную проводящую систему и значительно отличаются по субъединичному составу K⁺-каналов и механизмам регуля-

ции K^+ -тока от других клеток сердечной мышцы. Заметим, что при этом экспрессия NCS-1 в волокнах Пуркинье значительно превышает экспрессию KChIP2 [101]. В условиях *in vitro* NCS-1 и белок волокон Пуркинье DPP6 проявляют синергический эффект в отношении Kv4.3 и активируют его не менее эффективно, чем KChIP2. Таким образом, NCS-1 и белки KChIP обладают общими мишенями в сердце, но регулируют их в разных типах клеток либо на разных этапах развития сердечной мышцы.

Установлено, что NCS-1 может выступать в роли регулятора потенциалзависимых кальциевых каналов. Например, в хромаффинных клетках он активирует Ca^{2+} -каналы N- и P/Q-типов, функция которых в норме регулируется под действием АТФ и опиоидов. Так, введение мутации, препятствующей связыванию Ca^{2+} и, как следствие, активации NCS-1, способствует значительному усилению тока Ca^{2+} , что предполагает конститутивную стимуляцию указанных каналов [102]. Этот процесс управляется тирозинкиназами из семейства Src, которые фосфорилируют одну из субъединиц Ca^{2+} -канала P/Q-типа [103]. Примечательно, что в другой клеточной модели, на основе нейроэндокринных клеток, рекомбинантный NCS-1 наоборот подавлял ток Ca^{2+} через потенциалзависимые каналы L-, P/Q- и N-типа: Ca^{2+} -связанный NCS-1 одновременно снижал чувствительность Ca^{2+} -каналов к деполяризации мембраны и способствовал их инактивации после прохождения сигнала [104]. Оказалось, что восприимчивость каналов типа P/Q к действию NCS-1 определяется изоформой регуляторной β -субъединицы, входящей в их состав. Так, каналы, содержащие изоформу β_2 , в наибольшей степени подвержены NCS-1-зависимой регуляции. Предполагается, что белок может связывать β -субъединицу и мешать ее включению в состав канала, таким образом препятствуя активации последнего [104]. В нейронах NCS-1, как правило, выступает в роли активатора Ca^{2+} -каналов. Это может быть связано с тем, что в нервных клетках, в отличие от нейроэндокринных клеток, преобладают Ca^{2+} -каналы, содержащие субъединицу β_3 , устойчивую к ингибиторному действию NCS-1 [105]. Так, в чашечках Хельда NCS-1 стимулирует ток Ca^{2+} через каналы P/Q-типа, а в моторных нейронах NCS-1 активирует Ca^{2+} -каналы N-типа совместно с фактором роста GDNF [106, 107]. В нейронах верхнего шейного ганглия NCS-1 связывает C-концевой домен α -субъединицы каналов P/Q-типа и замедляет Ca^{2+} -зависимую инактивацию этих каналов, опосредуя развитие STP [108, 109]. Таким образом, регуляторная активность NCS-1 в отношении потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов определяется их субъединичным составом,

который, в свою очередь, может зависеть от типа клетки или даже от внутриклеточной локализации канала.

Кроме потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов NCS-1 взаимодействует и с другими типами каналов для этого катиона. В синаптических окончаниях NCS-1 образует прочный комплекс с Ca^{2+}/Na^+ -каналами TRPC5, которые участвуют в регуляции роста нейритов, и Ca^{2+} -зависимым образом стимулирует активность этих каналов [63]. NCS-1 также коиммунопреципитирует с рецептором-1 IP_3 (InsP₃R1), который функционирует как Ca^{2+} -канал на поверхности ЭПР, и активирует этот рецептор, тем самым запуская всплеск концентрации внутриклеточного Ca^{2+} [110]. Показано, что уровень InsP₃R1 в цитоплазме нейроэндокринных клеток повышается в присутствии избытка NCS-1 и InsP₃R1 обеспечивает локализацию NCS-1 в конусах роста нейронов [91, 111]. NCS-1 также регулирует активность другого IP_3 -рецептора – InsP₃R2 – в сердце эмбриона [39].

Регуляция рецепции

На основании некоторых данных NCS-1 отводится роль Ca^{2+} -зависимого модулятора рецепторных систем организма. Например, более 10% от суммарной экспрессии белка приходится на сетчатку глаза [25], где NCS-1 экспрессируется в том числе в фоторецепторных клетках – палочках и колбочках, отвечающих за прием и передачу светового сигнала. Методами иммуногистохимии установлено, что основная часть NCS-1 локализуется во внутренних сегментах и синаптических окончаниях фоторецепторов [112], а по результатам биохимических исследований он присутствует и в наружных сегментах этих клеток, содержащих родоспин и другие компоненты зрительного каскада [113, 114]. Снижение концентрации кальция в этом компартменте после прохождения светового сигнала запускает фосфорилирование (десенситизацию) фотовозбужденного родопсина родопсинкиназой (GRK1), контролируемое при участии НКС реверина, и активацию фоторецепторных гуанилатциклаз под действием белков GCAP (guanylate cyclase activating proteins), также относящихся к семейству НКС. Все эти события способствуют восстановлению уровня цГМФ и Ca^{2+} и возвращению фоторецепторов к темновому состоянию [115]. В ранних работах показано, что в присутствии Ca^{2+} NCS-1 ингибирует фосфорилирование родопсина под действием GRK1 *in vitro* [5], хотя физиологическая релевантность этого эффекта до сих пор остается недоказанной. Впоследствии была установлена колокализация NCS1 и GRK1 в наружных сегментах палочек сетчатки, а также продемонстрирована способность этих белков образовывать комплекс и даже разре-

шена кристаллическая структура последнего [113, 114, 116]. Показано также, что при добавлении к препаратам наружных сегментов палочек быка рекомбинантный ортолог NCS-1 – фреквенин – при низких концентрациях кальция (<150 нМ) стимулировал гуанилатциклазную активность [3]. В другом эксперименте NCS-1 также связывал и активировал фоторецепторную гуанилатциклазу ONE-GC, правда, уже при высоких концентрациях Ca^{2+} [117]. В целом, несмотря на имеющиеся данные, регуляторная активность NCS-1 в отношении компонентов зрительного каскада в наружных сегментах фоторецепторов все же требует дальнейших исследований. Добавим, что некоторые сигнальные партнеры NCS-1: $InsP_3R1$ и $GRK2$ – присутствуют и во внутренних сегментах фоторецепторов [118, 119]. Так, Ca^{2+} -зависимая регуляция IP_3 -рецепторов поверхности ЭПР (к ним относится $InsP_3R1$), в которой NCS-1 задействован в других типах клеток, обеспечивает выживание фоторецепторов в условиях стресса [120]. Функция $GRK2$ в фоторецепторах точно не выяснена, так как в них отсутствуют ее основные субстраты. Тем не менее недавно показано, что $GRK2$ может обладать широким интерактомом, который не ограничивается GPCR [87]. Кроме того, потенциальной мишенью NCS-1 могут быть Ca^{2+} -каналы L-типа и аденозиновые рецепторы $A_{2A}R$, экспрессирующиеся в ленточных синапсах фоторецепторов [121, 122].

Нейропротекторная активность NCS-1

Белок NCS-1 не только вовлечен в процессы роста и созревания нейронов, но и принимает участие в механизмах, обеспечивающих их выживание и восстановление после повреждений. Так, экспрессия NCS-1 в спинальных мотонейронах значительно возрастает после механических или химических повреждений [123]. NCS-1 проявляет нейропротекторную функцию в модели ишемии мозга, уменьшая область повреждения [22]. Нейропротекторные свойства NCS-1, по-видимому, объясняются его участием в PI3K/Akt сигнальном пути. Так, показано, что NCS-1 способствует увеличению содержания фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфата ($PI(3,4,5)P_3$) в плазматической мембране. С этим фосфоинозитидом связывается протеинкиназа Akt, что увеличивает ее локальную концентрацию на мембране и тем самым стимулирует ее фосфорилирование и активацию. Активированная Akt перемещается в ядро, где фосфорилирует ряд факторов транскрипции, обеспечивающих выживание нейронов [124]. Действительно, экспрессия рекомбинантного NCS-1 в нейронах способствует повышению уровня фосфо-Akt, ускоренному аксональному росту и восстановлению двигательной функции после травмы

пирамидного тракта у экспериментальных животных [125].

В ряде исследований выявлена способность NCS-1 нивелировать цитотоксические эффекты ионов кальция. Например, избыточная экспрессия NCS-1 способствует восстановлению нормальной митохондриальной функции и гомеостаза Ca^{2+} в клетках, делеционных по $WFS1$ – трансмембранному белку, который играет важную роль в транспорте ионов кальция между ЭПР и митохондриями [126]. $WFS1$ связывает NCS-1 и в комплексе с ним принимает участие в регуляции IP_3 -рецепторов на поверхности ЭПР [127]. Таким образом, NCS-1 можно рассматривать в качестве перспективной мишени для терапии синдрома Вольфрама – нейродегенеративного заболевания, ассоциированного с мутациями в гене $WFS1$. В клетках слуховых ядер ствола мозга в ответ на стресс (абляцию афферентных слуховых нейронов) не только значительно повышается экспрессия NCS-1, но и происходит перераспределение этого белка между синаптическими окончаниями и телом клетки [128]. В связи с тем, что слуховые нейроны отличаются очень высокой активностью, они нуждаются в эффективной регуляции присущей им Ca^{2+} -буферной системы [129]. NCS-1 может быстро детектировать локальные повышения концентрации Ca^{2+} и защищать эти нейроны от гибели, ассоциированной с избытком этого катиона. В целом, NCS-1 присутствует во множестве сенсорных систем и может защищать от Ca^{2+} -токсичности высокоактивные нейроны, к которым относятся также фоторецепторные клетки [30, 31, 130–132]. Как уже говорилось, NCS-1 задействован в PI3K/Akt-зависимом сигнальном пути, который запускает механизмы выживания и роста клеток в стрессовых условиях [93, 125, 133]. Именно активация этого пути необходима для сохранения фоторецепторов при светоиндуцированных повреждениях сетчатки и других дегенеративных заболеваниях, таких как пигментный ретинит [134, 135].

Наконец, появляется все больше данных, из которых можно сделать вывод о том, что NCS-1 вовлечен в процессы внутриклеточной антиоксидантной защиты. Например, действуя совместно с фактором роста GDNF, NCS-1 защищает клетки PC12 от апоптоза при воздействии высоких (до 300 мкМ) концентраций H_2O_2 [123]. В кардиомиоцитах в отсутствие NCS-1 развивается уязвимость к окислительному стрессу на фоне присутствия 100 мкМ H_2O_2 : повышается доля гибнущих клеток, падает выработка АТФ, снижается уровень митохондриального дыхания и концентрация компонентов дыхательной цепи, происходит деполяризация митохондриальной мембраны [133].

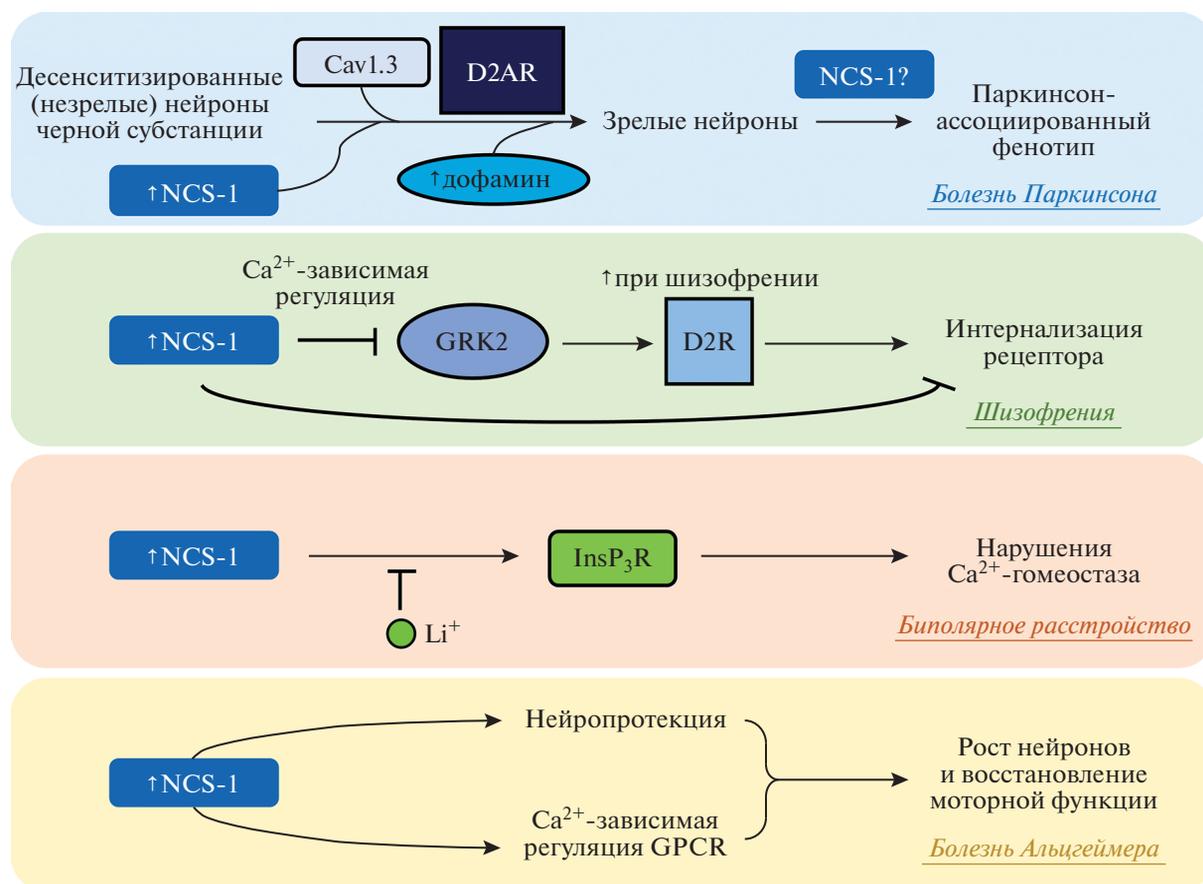


Рис. 3. Участие NCS-1 в патогенезе заболеваний нервной системы. Повышение экспрессии NCS-1 в пейсмекерных нейронах черной субстанции среднего мозга и NCS-1-опосредованная регуляция Ca²⁺-каналов Cav1.3 и дофаминовых ауторецепторов D2A приводят к адаптации нейронов к патологическим сигналам дофамина и формированию более жизнеспособного фенотипа. При шизофрении и биполярном расстройстве избыток NCS-1 препятствует нормальной интернализации рецептора D2R и приводит к его накоплению на мембране, что влечет повышение чувствительности нейронов к дофамину. Связываясь с рецептором инозитолтрифосфата (InsP₃R), избыточный NCS-1 способствует массовому высвобождению Ca²⁺ из ЭПР и нарушению Ca²⁺-гомеостаза. Комплекс NCS-1 с InsP₃R разрушается в присутствии ионов лития, которые широко применяют для лечения психических расстройств. В случае болезни Альцгеймера повышение уровня NCS-1 может быть компенсаторным ответом на гибель нейронов, так как этот белок вовлечен в пути Ca²⁺-зависимой регуляции роста и регенерации нейрональных отростков.

АБЕРРАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ NCS-1 ПРИ ПАТОЛОГИЯХ

Нарушения экспрессии и функции NCS-1 ассоциированы с рядом заболеваний [136]. В основном это психические расстройства (шизофрения и биполярное расстройство), нарушения развития нервной системы (аутизм) и нейродегенеративные заболевания (болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера) (рис. 3). В последние годы появляется все больше данных о роли NCS-1 в канцерогенезе [137, 138]. Развитие патологий может быть ассоциировано как с повышенной, так и с пониженной экспрессией NCS-1, а также с мутациями в гене *NCS1* и окислением белка. Следовательно, NCS-1 рассматривают как потенциальную мишень для антипсихотической, нейрорегенеративной и противоопухолевой терапии: для

ряда препаратов, нацеленных на модификацию комплексов NCS-1 с его сигнальными партнерами, уже подтверждена эффективность в клеточных и животных моделях некоторых заболеваний [137, 138].

Психические расстройства

Участие NCS-1 в регуляции дофаминергической сигнализации привлекло внимание к этому белку в контексте изучения когнитивных расстройств. У пациентов с шизофренией и биполярным расстройством примерно вдвое повышена экспрессия NCS-1 в префронтальной коре головного мозга [139]. Повышение уровня NCS-1 также коррелирует с возрастной деменцией [140]. В клеточной модели NCS-1 подавляет синтез и

протеинкиназа А (protein kinase A, PKA)-зависимое фосфорилирование белка DARPP-32, низкий уровень которого в префронтальной коре ассоциирован с шизофренией [141, 142]. Результатом избыточной активности NCS-1 может быть нарушение регуляции “тормозящих” рецепторов D2 и, как следствие, снижение уровня вторичного мессенджера цАМФ в клетке либо снижение возбудимости нейронов за счет увеличения K^+ -тока [86]. Перечисленные факторы могут способствовать снижению активности префронтальной коры, что характерно для этого заболевания.

Для биполярного расстройства характерны нарушения цикла сна и бодрствования, связанные с дисфункцией пейсмекерных нейронов в среднем мозге, вклад которых в общую электрическую активность мозга проявляется в виде γ -волновых колебаний [143]. Показано, что NCS-1 регулирует кальциевые токи, лежащие в основе γ -волн в нейронах педункулопонтинного ядра. Белок оказывает двухфазный эффект на активность γ -волн: при концентрации 1 мкМ значительно усиливает колебания, а при большом избытке (>10 мкМ), напротив, провоцирует их полное затухание [144]. Предполагается, что активность NCS-1 опосредована дисрегуляцией двух альтернативных сигнальных путей, в которых задействованы потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы P/Q-типа, запускающие пробуждение, либо каналы N-типа, поддерживающие фазу быстрого сна [145]. Связываясь с IP_3 -рецепторами в ЭПР, NCS-1 может индуцировать повышение внутриклеточного Ca^{2+} и активацию САМКП-киназ, непосредственно регулирующих активность Ca^{2+} -каналов [146]. Ионы лития, которые входят в препараты для лечения биполярного расстройства, препятствуют активации рецептора $InsP_3R1$ под действием NCS-1, а также нивелируют аномальную активность Ca^{2+} -каналов в педункулопонтинных нейронах [110, 147, 148].

Лечение антипсихотическими препаратами не оказывает воздействия на уровень NCS-1 [140, 149–151]. В то же время нейролептик хлорпромазин, который применяют для лечения шизофрении, связывается с NCS-1 в присутствии Ca^{2+} [152]. В свою очередь, противоэпилептическое средство вальпроат, применяемое для лечения биполярного расстройства, стимулирует экспрессию NCS-1 в передней доле мозга экспериментальных животных [19]. В связи с тем, что взаимодействие между D2R и NCS-1 рассматривается как мишень для антипсихотической терапии, был выполнен скрининг потенциальных ингибиторов этого связывания и выявлен ряд соединений, подавляющих взаимодействие NCS-1 с пептидом D2R. Такая активность выявлена в частности для алкалоидов метерголина, тетрандрина и резерпина [153].

Наркотическая зависимость

В ряде работ показано возможное участие NCS-1 в механизмах, обуславливающих наркотическую зависимость, развитие которой связано с нарушениями дофаминергической сигнализации и проницаемости K^+ -каналов в некоторых отделах мозга [154–156]. Так, повышенная экспрессия NCS-1 в префронтальной коре у лабораторных животных ассоциирована с большей склонностью к героиновой зависимости [157]. В модели зависимости от морфина экспрессия NCS-1 в миндалевидном теле мозга крысы значительно повышена при абстиненции [158]. Полиморфизм rs1054879 в некодирующей 3'-области гена *NCS1* значительно улучшал прогноз лечения от никотиновой зависимости у пациентов с определенным аллелем рецептора D2R [159]. Полиморфизмы rs1342043 и rs7849345 в интроне-1 гена *NCS1* ассоциированы с кокаиновой зависимостью [160]. Отметим, что вышеперечисленные мутации не ассоциированы с аминокислотными заменами в белке NCS-1 и не затрагивают известные сайты связывания транскрипционных факторов в регуляторных областях гена *NCS1* или в регуляторных микроРНК, так что механизм их действия пока остается неизвестным.

Умственная отсталость, ассоциированная с X-хромосомой

Белок NCS-1 связывается с внутриклеточным доменом белка IL1RAPL1, мутации в котором ассоциированы с наследственной формой умственной отсталости [161]. IL1RAPL1 представляет собой трансмембранный нейрональный белок, гомологичный рецептору интерлейкина-1 и Toll-подобным рецепторам. IL1RAPL1 локализуется в синаптических окончаниях нейронов, где он связывается с гуанилаткиназой PSD-95 и принимает участие в регуляции механизмов синаптогенеза и синаптической пластичности [162]. Мутации в гене *IL1RAPL1* ассоциированы с серьезными когнитивными нарушениями при отсутствии видимых дефектов развития мозга [163]. Показано, что IL1RAPL1 совместно с NCS-1 участвует в регуляции потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов N-типа [164], однако прямых указаний на участие NCS-1 в патологическом механизме, связанном с активностью мутантного IL1RAPL1, пока не выявлено.

Расстройства аутистического спектра

Расстройства аутистического спектра (РАС) — группа заболеваний, связанных с нарушениями развития нервной системы, которые выражаются в повторяющемся поведении и сниженной способности к коммуникации. Интересно, что у экспериментальных животных с фенотипом *Ncs1*^{-/-}

регистрируют нарушения социального поведения и когнитивной функции, сходные с теми, которые наблюдаются у пациентов с PAC [165]. NCS-1 также входит в число белков, мутации в генах которых ассоциированы с аутизмом [166]. Например, у одного из таких пациентов обнаружена замена R102Q в составе Ca^{2+} -связывающего центра белка [167]. Наличие этой мутации приводит к общей дестабилизации NCS-1 и значительным структурным перестройкам в его С-концевой области, а также к изменению динамики связывания белка с клеточными мембранами. Указанные факторы могут приводить к нарушению функции NCS-1 в клетке и лежать в основе дефектов Ca^{2+} -сигналикации при PAC [168].

Болезнь Паркинсона

Уровень экспрессии NCS-1 существенно снижен у пациентов с болезнью Паркинсона – нейродегенеративным заболеванием, связанным с нарушением функции дофаминовых рецепторов и утратой синаптической пластичности в черной субстанции, а также гибелью пейсмейкерных нейронов в этом отделе головного мозга [130]. Дофаминергические нейроны черной субстанции характеризуются интенсивным метаболизмом и высоким содержанием Ca^{2+} , что делает их особенно уязвимыми к окислительному стрессу и токсичности, вызванной избытком Ca^{2+} [169]. Показано, что в пресинаптических окончаниях нейронов черной субстанции NCS-1 Ca^{2+} -зависимым образом регулирует D2A-ауторецепторы дофамина, активность которых нарушена при болезни Паркинсона [170]. Эта регуляция контролируется током Ca^{2+} через потенциалзависимые каналы L-типа Cav1.3, которые рассматривают в качестве мишеней для лечения болезни Паркинсона [130, 171]. NCS-1 также связывается с митохондриальным белком PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1), мутации в гене которого у людей ассоциированы с наследственными формами болезни Паркинсона, однако физиологическая роль этого взаимодействия до сих пор не выяснена [81]. В выживших нейронах черной субстанции наблюдается, напротив, компенсаторное повышение экспрессии NCS-1, что, по-видимому, способствует их адаптации к избыточным уровням дофамина и/или ионов Ca^{2+} и выживанию при этом заболевании, то есть выполняет нейропротекторную функцию [172]. Действительно, в модели болезни Паркинсона подавление экспрессии NCS1 значительно снижает выживаемость клеток [130]. Фенотип *Ncs1*^{-/-} также характеризуется снижением экспрессии ряда белков: компонента комплекса I дыхательной цепи митохондрий ND1, митохондриальных белков-разобщителей UCP4 и UCP5, гликолитической енолазы ENO2, редоксчувствительного шаперона и

фактора транскрипции DJ-1 и Ca^{2+} -каналов Cav2.3 [173]. Эти изменения могут быть частью механизма адаптации, направленного на защиту нейронов от источников стресса, который выражается в снижении внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и интенсивности митохондриальной функции.

Болезнь Альцгеймера

Экспрессия NCS-1 в мозге значительно повышена при болезни Альцгеймера – нейродегенеративном заболевании со сложной этиологией, связанной в том числе с утратой связей между нейронами в результате формирования в нервной ткани бляшек из неправильно свернутого β -амилоида [174]. На животной модели (дрозофила) показано, что восстановление моторной функции и числа синаптических окончаний, которые были утрачены в ходе патологических процессов, вызванных токсичным амилоидным пептидом A β 42, может быть достигнуто за счет стабилизации комплекса ортолога NCS-1 – фреквицина – с белком Ric8a [175]. Этот белок локализуется с фреквицином и связывается с ним при низком уровне Ca^{2+} . Будучи регулятором GPCR, Ric8a стимулирует нейротрансмиссию и регулирует развитие нейрональных отростков. Предполагается, что фреквицин может играть роль Ca^{2+} -зависимого регулятора Ric8a, ингибируя его активность в состоянии покоя и высвобождая его в ответ на сигнал Ca^{2+} [176]. Кроме регуляции нейротрансмиссии (через регуляцию аналогов Ric8a или другие пути), потенциальная роль NCS-1 при болезни Альцгеймера может быть связана с его нейропротекторной активностью. Таким образом, повышение экспрессии белка NCS-1 при этом заболевании может быть важным компенсаторным механизмом.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА И СВОЙСТВА NCS-1

Описанные выше особенности активности NCS-1 в норме и при патологии связаны с его мембранной локализацией и способностью распознавать и регулировать сигнальные мишени, что определяется конформационными свойствами этого белка. Последние модулируются за счет связывания внутриклеточных лигандов (в первую очередь, металлов и сигнальных фосфолипидов) и чувствительны к изменениям внешних условий, таких как редокс-потенциал внутриклеточной среды. Многообразие функций NCS-1 делает его уникальным среди белков НКС. Большинство представителей семейства модулирует активность строго определенной мишени или нескольких близких по структуре мишеней (K^+ -каналов, гуанилатциклаз и т.д.) в определенном

узком диапазоне концентрации Ca^{2+} . Однако, несмотря на выраженное сходство всех уровней структуры с другими НКС, NCS1 может регулировать активность множества партнеров (не сегодняшний момент идентифицировано более 20 белков [177]), что значительно расширяет спектр его сигнальной активности. При анализе структуры NCS-1 выявлены не только консервативные среди НКС участки, отвечающие за связывание ионов кальция, но и уникальные последовательности, которые сосредоточены в основном в N-концевой и C-концевой областях этих белков и, по-видимому, участвуют в образовании уникальных сетей внутримолекулярных и межмолекулярных взаимодействий, определяющих сродство к металлам, положение миристоильной группы, а также чувствительность белка к фосфолипидному составу клеточных мембран и узнавание мишеней.

Молекулярные свойства NCS-1

Как и другие белки НКС, NCS-1 представляет собой α -спиральный белок, содержащий четыре Ca^{2+} -связывающих мотива типа EF-hand (EF1–EF4). EF1 и EF2 вместе составляют N-концевую, а EF3 и EF4 – C-концевую домены белка. Указанные домены соединены линкером, содержащим консервативный остаток глицина, что обуславливает их конформационное вращение друг относительно друга. Каждый мотив EF-hand состоит из двух α -спиралей и расположенной между ними петли. Ион кальция координируется атомами кислорода основной и боковой цепи остатков аспартата и/или глутамата в 1(x), 3(y), 5(z), и 12(–z) положениях петли, карбонильным кислородом пептидной связи в 7(–y) позиции петли, а также гидроксидом молекулы воды, ассоциированной с остатком в 9(–x) положении петли за счет водородных связей [178]. В центре петли находится короткий β -тяж из трех аминокислотных остатков (это единственная β -структура в белках НКС). При связывании иона кальция происходит смещение α -спиралей мотива EF-hand вокруг остатка глицина в позиции 6 петли, что переводит его в открытую конформацию. Во всех НКС, включая NCS-1, EF1 не способен связывать Ca^{2+} из-за присутствия не координирующих этот металл остатков лизина и цистеина в позициях 1 и 3 соответственно, а также Pго в позиции 4 [179]. Для NCS-1 позвоночных животных были получены кристаллоосциллограммы структуры Ca^{2+} -связанных форм немиристоилированного белка человека и крысы (PDB 1G8I и 5AEQ соответственно) [18, 116]. Кроме того, трехмерная структура немиристоилированного Ca^{2+} -заполненного NCS-1 человека разрешена методом ЯМР-спектроскопии (PDB 2LCP) [180]. Согласно последней, белок содержит 9 α -спиралей, 4 коротких β -тяжа (в составе Ca^{2+} -связывающих сайтов EF-hand) и 3 неструк-

турированные петли (между EF1 и EF2, между EF3 и EF4 и после EF4).

N-конец NCS-1 подвергается котрансляционному миристоилрованию под действием N-миристоилтрансферазы-1, причем белок присутствует в клетке исключительно в такой форме, что подтверждено данными масс-спектрометрического анализа [181]. Как и в большинстве НКС, миристоильная группа NCS-1, во-первых, отвечает за его связывание с клеточными мембранами и, во-вторых, необходима для поддержания структуры конформеров белка. В отсутствие Ca^{2+} она погружена внутрь молекулы белка, образуя многочисленные контакты с гидрофобной сердцевинной глобулы [182–184]. В общем случае миристоильная группа играет роль своего рода шаперона для белков НКС: набор взаимодействующих с ней остатков и соответствующая структура апоформы белка уникальны для каждого представителя семейства. При связывании кальция у части НКС (GCAPs) миристоильная группа остается внутри структуры белка, в то время как у другой части (рековерин, VILIP-1, нейрокальцин- δ и гиппокальцин) участвует в механизме, называемом Ca^{2+} -миристоильным переключателем. В последнем случае конформационные перестройки в ответ на координацию кальция EF-hand-мотивами приводят к экспонированию в раствор как миристоильной группы (чтобы впоследствии обеспечить связывание белка с мембранами), так и остатков, исходно формирующих для нее гидрофобный карман в структуре белка. Экспонированные остатки гидрофобного кармана образуют контакты с мишенями белков НКС. NCS-1, по-видимому, не имеет функционального Ca^{2+} -миристоильного переключателя. Некоторые уникальные элементы структуры этого белка обеспечивают необычный, Ca^{2+} -независимый, характер его взаимодействия с мембранами, в котором однако принимает участие миристоильная группа (см. раздел “Связывание с мембранами”); при этом наличие последней в значительной степени определяет структуру не только бескальциевой, но и Ca^{2+} -связанной формы белка [185]. Играя ключевую роль в мембранной ассоциации NCS-1, миристоильная группа обеспечивает правильную внутриклеточную локализацию белка, а также его функциональную активность. Так, в отсутствие миристана NCS-1 утрачивает способность активировать $\text{PI4K}\beta$ и ингибировать потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы N-типа, хотя сохраняет некоторые другие функции: например, способность индуцировать STP в нейронах гиппокампа [50, 72, 104, 186].

Главное отличие структуры NCS-1 от других НКС заключается в наличии протяженного гидрофобного кармана, сформированного остатками как из N-концевого, так и из C-концевого доменов белка. Доступность этого кармана и, как

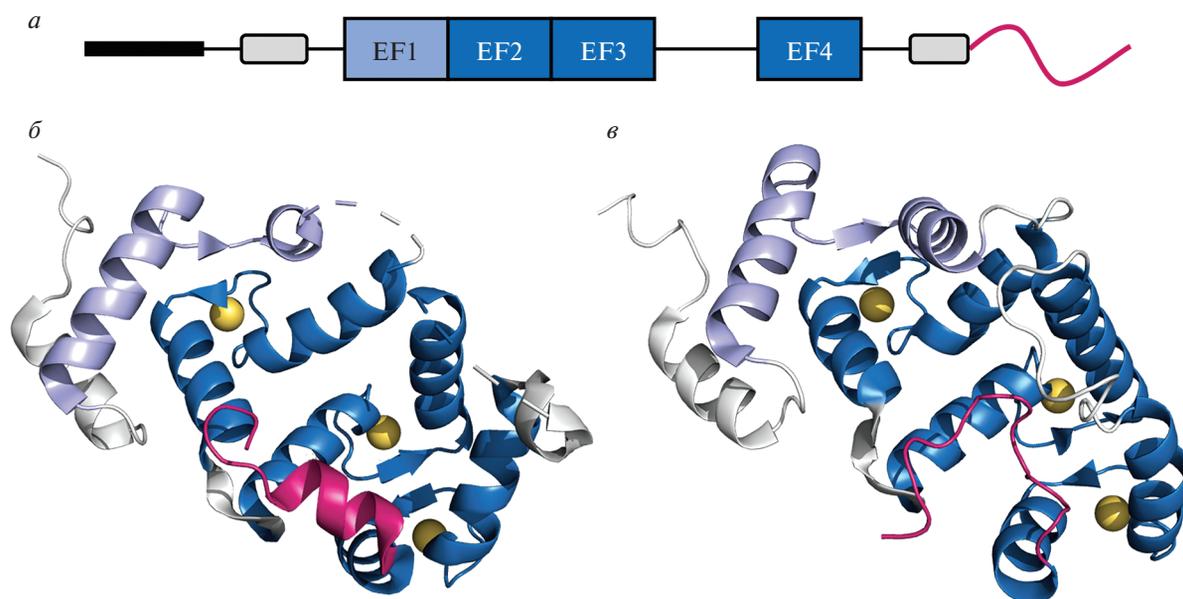


Рис. 4. Молекулярная структура NCS-1. *а* – Схема доменной структуры NCS-1. *б* – Кристаллическая структура Ca^{2+} -связанной формы NCS-1 (PDB 5AEQ). *в* – ЯМР-структура Ca^{2+} -связанного NCS-1 (PDB 2LCP). Цветом выделены нефункциональный (голубой) и функциональные (синий) EF-hand-мотивы и С-концевой сегмент (розовый). Ионы кальция представлены желтыми сферами.

следствие, уникальное строение мультифункционального сайта связывания мишеней NCS-1 в значительной степени обеспечивается структурой его так называемого “С-концевого сегмента” – участка P177–V190 полипептидной цепи (рис. 4*а*) [114, 187]. В кристалле это последняя, десятая, α -спираль белка (рис. 4*б*), в то время как в ЯМР-структуре эта область неструктурирована и образует множественные контакты с поверхностью открытого гидрофобного кармана на всем его протяжении (рис. 4*в*) [180]. За счет этого взаимодействия С-концевой сегмент значительно стабилизирует Ca^{2+} -связанную форму NCS-1: при его удалении белок приобретает менее компактную и более динамичную структуру, а также склонность к образованию димеров [116, 188]. Согласно молекулярно-динамическим моделям, удаление С-концевого сегмента модифицирует структуру белка примерно так же, как повышение температуры на 6°C [189]. Важно, что в отсутствие мишени С-концевой сегмент Ca^{2+} -заполненного NCS-1 прикрывает остатки гидрофобного кармана, одновременно поддерживая конформационную стабильность молекулы [180]. В присутствии мишени (например, D2R) С-концевой сегмент NCS-1 смещается, открывая доступ к соответствующему ей сайту [190] (см. раздел “Взаимодействие с белками-мишенями”).

Связывание кальция и магния

Белок NCS-1 характеризуется относительно высоким сродством к ионам кальция [191]. Ми-

ристоилирование NCS-1 приводит к повышению его Ca^{2+} -чувствительности, а также обуславливает кооперативность связывания ионов этого металла [68, 192, 193]. Миристоилированный NCS-1 последовательно связывает три иона Ca^{2+} с константами диссоциации, равными 60 мкМ, 53 нМ и 377 нМ, причем для первых двух сайтов характерна кооперативность связывания [193]. Установлен следующий порядок заполнения сайтов в миристоилированном NCS-1: EF2 \rightarrow EF3 \rightarrow EF4, где EF2 обладает наименьшим, а EF3 наибольшим сродством к Ca^{2+} [192]. Координация Ca^{2+} вызывает последовательные конформационные изменения в NCS-1, в результате которых возрастает α -спиральность и гидрофобность поверхности белка, что свидетельствует об экспонировании остатков гидрофобного кармана, по всей видимости, участвующих в связывании мишеней [191, 193, 194]. Помимо кальция NCS-1 обладает сравнительно высоким сродством к Mg^{2+} : миристоилированный белок некооперативно связывает два таких иона со средней константой 17 мкМ [191]. В присутствии физиологических концентраций Mg^{2+} (порядка 0.9 мМ) сродство белка к Ca^{2+} снижается: соответствующая усредненная константа диссоциации возрастает с 90 до 440 нМ [195]. Магний связывается в EF2 и EF3, из которых вытесняется кальцием, при этом EF4 остается исключительно Ca^{2+} -связывающим сайтом [191]. В то время как координация кальция значительно стабилизирует NCS-1, обеспечивает восстановление его структуры после воздействия денатурирующих агентов и

защищает белок от трипсинового протеолиза, связывание магния лишь частично стабилизирует апоформу и снижает ее поверхностную гидрофобность [185, 191, 194]. Величина сродства NCS-1 к кальцию в присутствии магния (300–400 нМ) согласуется с предполагаемой регуляторной функцией NCS-1 в синаптических окончаниях нейронов, для которых характерны изменения уровня внутриклеточного Ca^{2+} как раз в субмикромольном диапазоне. Таким образом, в синапсах NCS-1, по-видимому, быстро реагирует на небольшие локальные изменения концентрации кальция в условиях, когда другие Ca^{2+} -сенсоры (кальмодулин, реверин, VILIP-1) еще неактивны.

Связывание с мембранами

Практически во всех типах тканей, где был обнаружен NCS-1, он локализуется в примембранном слое [27, 73]. Связывание с клеточными мембранами играет важнейшую роль в функциональной активности всех белков НКС, поскольку позволяет им компартиментализоваться с белками-мишенями. NCS-1 отличается тем, что обладает высоким сродством к мембранам не только в присутствии, но и в отсутствие ионов Ca^{2+} . Так, при фракционировании мозгового вещества надпочечников в присутствии хелатора Ca^{2+} NCS-1 обнаружен как в цитоплазматической, так и в микросомальной фракциях [66]. Сведения о Ca^{2+} -чувствительности связывания NCS-1 с очищенными клеточными мембранами противоречивы: в одной работе [68] для него не обнаружено Ca^{2+} -зависимости при связывании с мембранами из мозга крысы, в другой [117] он Ca^{2+} -зависимо связывался с мембранами гиппокампа быка. Однако в условиях клетки мембранная локализация NCS-1 все же обладает слабой, но достоверной чувствительностью к изменениям концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . Например, в нейроэндокринных клетках открытие Ca^{2+} -каналов в ответ на стимуляцию пуринергических рецепторов способствует повышению доли мембранной формы NCS-1 с 75 до 90% [37]. Наиболее вероятно, что в отсутствие Ca^{2+} мембранная и растворимая формы NCS-1 находятся в динамическом равновесии, а в присутствии Ca^{2+} это равновесие смещается в сторону мембранной формы, то есть связывание NCS-1 с мембранами все же Ca^{2+} -зависимый процесс [167]. Примечательно, что эта Ca^{2+} -зависимость нарушается при внесении замены R102Q, ассоциированной с аутизмом: наличие мутации приводит к “замораживанию” бескальциевой формы белка на мембране [167].

Отсутствие функционального Ca^{2+} -миристоильного переключателя у NCS-1 и, как следствие, лишь частичная обратимость его взаимодействия с клеточными мембранами, по всей видимости,

обеспечивается уникальными элементами его структуры, отсутствующими у других НКС. Например, такую роль может играть N-концевая α -спираль белка между сигналом миристоилирования и EF1-мотивом. Так, если внести эту последовательность в НКС с функционирующим Ca^{2+} -миристоильным переключателем – в гиппокальцин, – то он приобретает способность связываться с мембранами в отсутствие Ca^{2+} , подобно NCS-1. Высказано предположение, что жесткая структура этой α -спирали, стабилизированная водородными связями между боковыми группами остатков E14–R18 и E15–K19, фиксирует N-конец и миристоильную группу белка в экспонированном положении [196]. В связывании NCS-1 с мембранами могут быть задействованы и другие элементы его структуры, такие как C-концевой сегмент. Например, пересадка этого участка из реверина (НКС с функционирующим Ca^{2+} -миристоильным переключателем) в NCS-1 придает последнему способность взаимодействовать с фоторецепторными мембранами с более низким сродством, однако полностью обратимым Ca^{2+} -зависимым образом. Эти данные позволяют предположить, что C-концевой сегмент регулирует обратный захват миристоильной группы бескальциевой формой NCS-1 [114].

Сродство белков НКС к различным клеточным мембранам существенно различается, что может определяться их чувствительностью к липидному составу, регулируемой с помощью специальных аминокислотных остатков, расположенных на N-конце этих белков вблизи миристоильной группы [197–199]. Например, NCS-1 проявляет повышенное Ca^{2+} -зависимое сродство к PI4P и фосфатидилсерину (PS) ($K_d = 12$ мкМ), однако связывается с различающимися по фосфолипидному составу гиппокампальными и фоторецепторными мембранами Ca^{2+} -независимым образом [193, 200, 201]. В последнем случае связывание в меньшей степени зависит от миристоилирования и более чувствительно к замене N-концевых остатков: K3, K7 и/или K9, – что отражает сродство белка к отрицательно заряженным фосфолипидам. Среди мажорных фосфолипидов мембраны NCS-1 действительно предпочитает PS и PI, причем взаимодействие с первым ингибируется в результате замен указанных N-концевых лизинов белка. Интересно, что NCS-1 также связывается с фосфоинозидами, преимущественно PI3P, причем для этого сигнального фосфолипида предусмотрен специальный сайт в N-концевом домене, что говорит о важности указанного взаимодействия для сигнальной функции белка [201].

Многие белки-участники синаптической передачи, включая белки комплекса SNARE и Ca^{2+} -каналы Cav2.1, входят в состав устойчивых к действию детергентов мембранных микродоменов

или “рафт-структур” (detergent-resistant membranes, DRM), обогащенных холестерином [202]. Подобная организация обеспечивает колокализацию регуляторных белков и их мишеней и быстрый ответ на локальные сигналы Ca^{2+} . Показано, что при стимуляции брадикинином нейроэндокринных клеток NCS-1 в них переходит в DRM, которые обогащены не только холестерином, но и PI(4,5)P₂ [203]. Интересно, что NCS-1 и белки SNARE присутствуют в разных микродоменах и NCS-1, судя по всему, не является прямым регулятором компонентов экзоцитоза, а управляет этим процессом опосредованно – за счет модуляции гомеостаза Ca^{2+} в синаптических окончаниях [68]. Основной белковый компонент DRM – кавеолин-1. Это трансмембранный каркасный белок, обладающий регуляторной активностью в отношении различных сигнальных белков. Оказалось, что в фоторецепторных клетках сетчатки NCS-1, как и некоторые другие НКС, может взаимодействовать с кавеолином-1 в составе мембран. Образование комплекса происходит за счет взаимодействия с каркасным доменом 1–101 белка. Примечательно, что с кавеолином-1 связывается только бескальциевая форма NCS-1. Таким образом, посредством связывания с кавеолином-1 NCS-1 может удерживаться на мембранах (в DRM) при низком уровне кальция, что, по-видимому, усиливает его активность или обеспечивает более быстрые ответы на Ca^{2+} -сигналы, в том числе в рамках каскада фототрансдукции [113].

Взаимодействие с белками-мишенями

На основании структурного анализа комплексов NCS-1 с большинством сигнальных партнеров можно заключить, что в этих взаимодействиях участвует протяженный сайт в молекуле Ca^{2+} -сенсора, который состоит из консервативных остатков гидрофобного кармана и доступ к которому регулируется при участии С-концевой области белка. Например, дрожжевой фреквенин Ca^{2+} -независимым образом связывает N-концевой участок *Pik1* – ортолога PI4K позвоночных – в соотношении 1 : 1 с константой диссоциации порядка 140 нМ [181]. При этом взаимодействии С-концевой сегмент фреквенина смещается, высвобождая остатки гидрофобного кармана, которые, в свою очередь, образуют контакты с двумя гидрофобными α -спиралями *Pik1* (125–136 и 156–169 а.о.), соединенными неупорядоченным U-подобным участком. Указанные спирали связываются в антипараллельной ориентации: N-концевой участок фрагмента *Pik1* в С-концевом домене фреквенина, а С-концевой участок *Pik1* в N-концевом. Подобный характер связывания может служить объяснением механизму активации *Pik1*: при взаимодействии с фреквенином полипептид-

ная цепь киназы изгибается таким образом, чтобы регуляторный домен LKU на N-конце молекулы сближался с киназным доменом на ее С-конце и активировал последний [204]. NCS-1 взаимодействует с *Pik1* по такому же механизму и с таким же средством (150 нМ) [17].

Аналогичная конфигурация взаимодействия наблюдается и в случае D2R. В присутствии Ca^{2+} NCS-1 связывает С-концевой участок рецептора D2 (430–444 а.о.) в соотношении 1 : 2 с константой диссоциации, равной 14 мкМ (по другим данным 40 мкМ) [116, 190]. Оба участка образуют α -спирали, причем одна из них связывается в N-концевом домене NCS-1, а вторая – в С-концевом домене, ориентируясь С-концами навстречу друг другу (рис. 5а) [116, 190]. Наиболее выраженные перестройки в молекуле NCS-1 при связывании D2R происходят в области петли между EF3 и EF4, которая, как и С-концевой сегмент, отличается вариабельностью среди белков семейства и, таким образом, может отвечать за формирование уникальных сайтов связывания белков-партнеров. Однако С-концевой сегмент белка также участвует в общем структурировании комплекса, принимая конформацию, состоящую из двух коротких α -спиралей (177–180 и 184–188 а.о.), соединенных петлей. Одновременное связывание двух молекул D2R может иметь важное физиологическое значение с учетом того, что этот рецептор функционирует в виде димера.

В случае еще одной потенциальной мишени NCS-1 – GRK1 (родопсинкиназы) – в связывании с NCS-1 вовлекается тот же ее N-концевой участок (1–25 а.о.), что и при связывании с другим НКС – рековерином, доказанным модулятором активности фермента в сетчатке [205]. В то же время положение пептида GRK1 в молекуле NCS-1 заметно отличается от такового в рековерине: он располагается в глубине гидрофобного кармана белка между N- и С-концевыми доменами (рис. 5б). Подобное положение также регулируется С-концевым сегментом NCS-1, который в присутствии мишени смещается, утрачивая значительную часть контактов с остальной молекулой белка [114, 116, 206]. Роль С-концевого сегмента NCS-1 в организации GRK1-связывающего сайта подтверждается тем фактом, что замена этого участка на соответствующую последовательность рековерина существенно сказывается на эффективности ингибирования ферментативной активности GRK1 [114].

Структуры комплексов NCS-1 с другими мишенями пока не разрешены, однако и здесь косвенные данные указывают на гидрофобный карман и С-концевой сегмент как основные элементы структуры, опосредующие взаимодействие. Например, комплекс NCS-1/фреквенина с белком *Ric8a* эффективно разрушается при добавле-

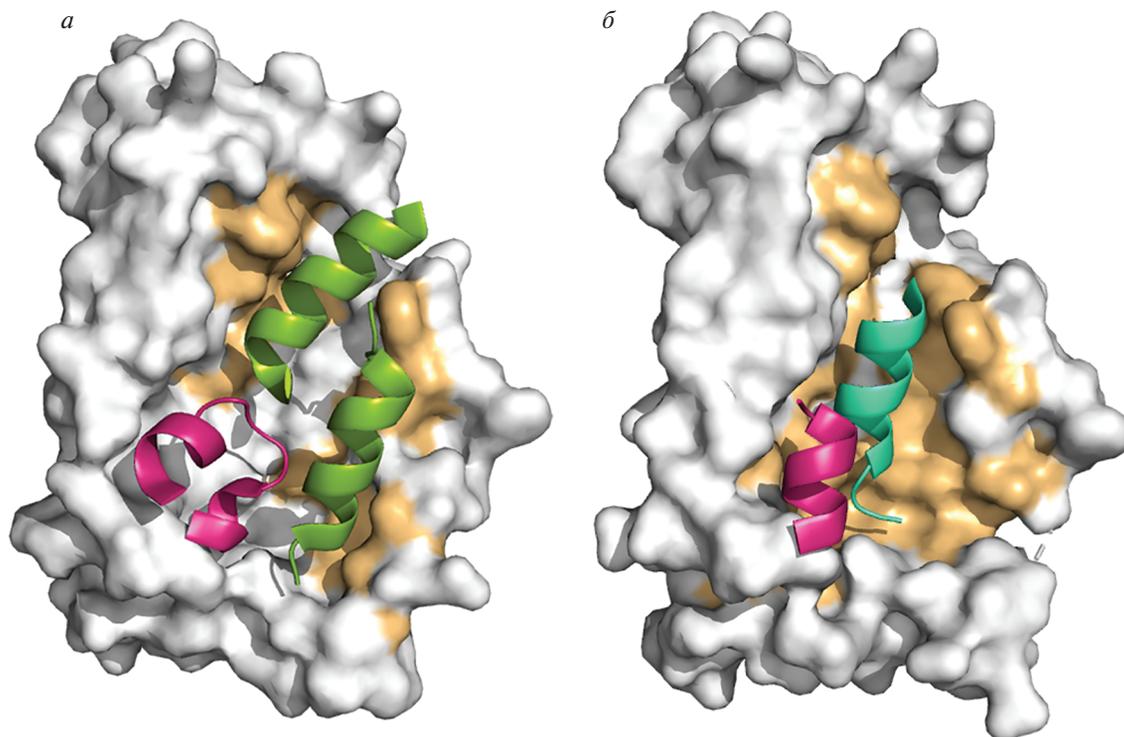


Рис. 5. Структуры комплексов NCS-1 с белками-мишенями. *а* – Комплекс NCS-1 с двумя фрагментами (430–444 а.о.) рецептора дофамина D2R (PDB 5AER). *б* – Комплекс NCS-1 с фрагментом (1–25 а.о.) GRK1 (PDB 5AFP). Цветом выделены остатки гидрофобного кармана, образующие интерфейс связывания мишени (оранжевый), С-концевой сегмент (розовый), фрагменты D2R (зеленый) и GRK1 (бирюзовый).

нии антипсихотических препаратов фенотиазинов, которые образуют контакты одновременно с остатками гидрофобного кармана и С-концевого сегмента NCS-1 и таким образом, вероятно, закоривают последний в гидрофобном кармане, препятствуя связыванию мишени [207, 208]. Связывание Ric8a в гидрофобном кармане NCS-1 происходит даже в отсутствие кальция [176]. Это подтверждается тем фактом, что низкомолекулярные соединения, которые вытесняют С-концевой сегмент из гидрофобного кармана, стабилизируют соответствующий комплекс [175]. Ca²⁺-зависимое связывание NCS-1 с супрессорным доменом рецептора InsP₃R1 (66–110 а.о.) также происходит с участием гидрофобного кармана, поскольку ключевую роль в нем играет остаток L89, входящий в состав этой структуры и принимающий участие в связывании других мишеней, включая D2R и GRK1 [206, 209]. В механизме Ca²⁺-независимого взаимодействия NCS-1 с IL1RAPL1 остатки гидрофобного кармана не задействованы, однако внутриклеточный домен IL1RAPL1 (549–644 а.о.) связывается непосредственно с С-концевым сегментом NCS-1 [161]. Установлено, что мутация R102Q, ассоциированная с аутизмом, не сказывается на этом взаимодействии, однако затрудняет погружение С-кон-

цевого сегмента в гидрофобный карман и стабилизирует последний в открытом положении, потенциально снижая специфичность регуляторной активности NCS-1. Действительно, в структуре NCS-1 присутствует сеть ионных взаимодействий между остатками С-концевого сегмента и белковой глобулой, в то время как мутация R102Q приводит к перестройке этой сети и утрате С-концевым сегментом характерной для него гибкости [167, 210, 211]. Это приводит, например, к повышению эффективности связывания NCS-1 с D2R, что может также играть роль в патогенезе аутизма, ассоциированного с мутацией R102Q [190, 212].

В целом, гибкий и подвижный С-концевой сегмент NCS-1 регулирует доступ к гидрофобному карману белка, формируя специфический сайт связывания для каждой из его мишеней. В отличие от остатков гидрофобного кармана, С-концевой сегмент NCS-1 уникален среди белков НКК и вследствие этого представляет собой удобную мишень для перспективных лекарственных препаратов, направленных на селективное подавление aberrантной функции NCS-1 без воздействия на другие белки НКК. Роль С-концевого сегмента в качестве внутреннего ингибитора NCS-1 подтверждена в ряде исследований. В общем случае добавление к белку пептида, имитиру-

ющего С-концевой сегмент, в высокой концентрации блокирует функциональную активность NCS-1, конкурируя за взаимодействие с его мишенями. Например, введение избытка С-концевого пептида в синапсы экспериментальных животных полностью нейтрализует способность NCS-1 активировать синаптическую передачу [106]. Кроме того, как упоминалось выше, одним из вариантов таргетной терапии в отношении активности NCS-1 может быть использование низкомолекулярных соединений, регулирующих подвижность его С-концевого сегмента. Подобные подходы имеют терапевтический потенциал при таких патологиях как синдром хрупкой X-хромосомы, болезнь Альцгеймера и др. [175, 208].

РЕГУЛЯЦИЯ НОРМАЛЬНОЙ И ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ NCS-1

Связывание ионов цинка

Недавно продемонстрировано, что помимо кальция и магния NCS-1 связывает ионы цинка, причем апоформа белка связывает три Zn^{2+} в два высокоаффинных (106 нМ) и один низкоаффинный (4 мкМ) сайт, в то время как магниевая и кальциевая формы, доминирующие в физиологических условиях, связывают по два иона цинка с субмикромольным сродством. Цинксвязывающие сайты, по-видимому, перекрываются с EF-hand-мотивами: высокие концентрации цинка вытесняют магний из этих мотивов и снижают стехиометрию связывания кальция с белком. При насыщении цинком NCS-1 проявляет в 14 раз большее сродство к кальцию в одном из сайтов, что повышает общую чувствительность белка к ионам этого металла. Важно, что заполнение Zn^{2+} -связывающих сайтов оказывает выраженные, но разнонаправленные эффекты на вторичную структуру, конформационное состояние и, как следствие, функциональные свойства NCS-1. Так, высокоаффинное связывание цинка повышает термостабильность бескальциевой формы NCS-1 и способствует взаимодействию его Ca^{2+} -связанной формы с белками-мишенями, такими как D2R и GRK1. Напротив, низкоаффинное связывание цинка способствует агрегации NCS-1, сопровождающейся образованием патологических скрученных макроструктур белка. Таким образом, результатом сложных взаимозависимых взаимодействий NCS-1 с магнием, кальцием и цинком является появление разнообразных конформаций белка, что, в свою очередь, модулирует его функциональный статус [213].

В целом, способность воспринимать колебания концентраций внутриклеточного цинка, по-видимому, относится к общим свойствам белков НКС, которые могут быть условно разделены на три категории: устойчивые к цинку Ca^{2+} -сенсорные

белки; физиологические сенсоры Ca^{2+} и Zn^{2+} , способные координировать мобильный цинк; а также патологические сенсоры Ca^{2+} и Zn^{2+} , связывающие цинк в только аномально высоких концентрациях, что приводит к их денатурации и агрегации [214]. NCS-1 занимает промежуточное положение в этой классификации и в определенных условиях может выступать в роли как физиологического, так и патологического сенсора цинка. Содержание цинка в нервной ткани чрезвычайно высокое, однако его свободная концентрация строго регулируется за счет работы системы цинковых транспортеров и высокоаффинных Zn^{2+} -буферных белков, а также менее аффинных Zn^{2+} -регуляторных белков, обеспечивающих перенос и передачу мишеням мобильного цинка [215]. В этом случае aberrантное повышение концентрации полностью высвободившегося цинка вызывает мощный нейротоксический эффект, ассоциированный с рядом нейродегенеративных и нейроофтальмологических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, возрастная макулярная дегенерация и глаукома [216–218]. Можно предположить, что NCS-1 не только осуществляет взаимосвязь между Ca^{2+} -зависимыми и Zn^{2+} -зависимыми сигнальными путями в здоровых нейронах, но и служит одним из триггеров, которые опосредуют инициацию патологических механизмов, ассоциированных с нейротоксичностью цинка.

Редокс-регуляция

Примечательно, что повышение концентрации как мобильного (находящегося в составе сравнительно лабильных комплексов с сигнальными белками), так и свободного цинка в клетке часто связано с окислительным стрессом [216]. В этих условиях цинк может высвободиться из буферных белков (преимущественно металлотионеинов) в ответ на окисление остатков цистеина, входящих в состав высокоаффинных сайтов связывания этого металла (“цинковых пальцев”) [219]. Как уже говорилось, NCS-1 может обеспечивать выживаемость клеток в условиях окислительного стресса. Таким образом, помимо опосредованных эффектов можно предположить наличие у него собственной редоксчувствительности, то есть способности изменять конформацию и сигнальную активность в ответ на изменение окислительно-восстановительного (редокс) потенциала клеточной среды. Действительно, некоторые НКС, такие как VILIP-1 и рековерин, – это редоксзависимые белки [220–222]. В случае рековерина это свойство обеспечивается за счет единственного в его структуре, консервативного среди НКС, остатка цистеина (в структуре нефункционального EF1-мотива), окисление которого приводит к образованию дисульфидного димера

(dRec) и/или окисленного мономера (с образованием остатка сульфеновой или сулфиновой кислот) белка – с измененной функциональной активностью [223, 224]. Важно отметить, что накопление dRec удалось зафиксировать непосредственно в клетках сетчатки, которая среди всех тканей организма наиболее уязвима для окислительного стресса [220–224]. Так, фоторецепторы обладают высокой метаболической активностью, характеризуются высоким уровнем потребления кислорода и уровнем внутриклеточного Ca^{2+} , а также постоянно подвергаются световому облучению и содержат значительное количество фоточувствительных молекул, которые генерируют активные формы кислорода в ответ на облучение светом. Кроме того, фоторецепторные мембраны обогащены полиненасыщенными жирными кислотами, которые особенно восприимчивы к окислительным повреждениям [225–227]. NCS-1 находится в аналогичных условиях, поскольку интенсивно экспрессируется в нейронах сетчатки (включая фоторецепторы) и содержит единственный остаток цистеина в том же положении, что и реверин. Более того, в ранних работах, посвященных исследованию структурно-функциональных свойств рекомбинантного немиристоилированного NCS-1, показано, что поверхностная доступность сульфгидрильной группы этого остатка цистеина может изменяться при связывании физиологических катионов (Mg^{2+} или Ca^{2+}), а значит не исключено ее участие в механизмах редокс-регуляции [194].

Недавно с использованием клеточной модели показано, что NCS-1 действительно является редоксчувствительным белком, реагируя на окисляющие условия образованием дисульфидного димера (dNCS-1), который накапливается в клетке в виде точечных скоплений в перинуклеарной области [228]. Формирование dNCS-1 представляет собой структурно детерминированный процесс, который не зависит от уровня внутриклеточного кальция, однако стимулируется при повышении концентрации свободного цинка, то есть в условиях, свойственных окислительному стрессу. Важно отметить, что окисленный белок обладает измененной чувствительностью к кальцию и функциональной активностью: связывает только один Ca^{2+} на мономер и имеет характерную структуру со сниженной α -спиральностью и термостабильностью и увеличенной гидрофобностью поверхности. Также как усиление конформационной гибкости C-концевого сегмента в мутанте NCS-1 R102Q приводит к повышению эффективности его связывания с D2R [192, 213], повышенная конформационная гибкость субчастиц в dNCS-1 проявляется в 20-кратном росте его сродства к GRK1 и значительном усилении ингибиторной активности в отношении фермента [228].

В цитоплазме клеток dNCS-1 может восстанавливаться при участии тиоредоксиновой системы. Таким образом, окисление NCS-1 – обратимый процесс, что открывает возможность для участия белка в механизмах редокс-регуляции. В то же время накопление dNCS-1 приводит к возникновению агрегатов белка, что, по всей видимости, дополнительно стимулируется цинком [213]. До определенного предела агрегаты окисленного NCS-1 могут утилизироваться протеасомой [228], однако образование избытка подобных окисленных форм обычно запускает реакцию несвернутых белков и вызывает апоптоз клетки [229]. Интересно, что в клетках ретинобластомы Y79, которые имеют общих предшественников с фоторецепторами сетчатки и продуцируют все основные зрительные белки [230], подавление экспрессии NCS-1 снижает их восприимчивость к апоптозу, вызванному окислительным стрессом. Более того, величина редокс-потенциала среды, при котором окисление NCS-1 максимально, приближается к уровню, характерному для апоптоза [228]. Учитывая эти данные, мы суммировали опосредованные NCS-1 редоксзависимые пути, регулирующие выживание или гибель клеток в ответ на окисляющие условия (рис. 6). В результате NCS-1 может выступать и как антиоксидантный нейропротекторный белок [123, 133], и, будучи окисленным до dNCS-1, проявлять aberrantную активность, которая может привести к гибели клеток и развитию нейродегенеративных процессов, связанных с заболеваниями нервной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на уникальное среди НКС многообразие функций NCS-1 в клетках нервной системы, для большинства организмов этот белок не относится к незаменимым. Этот парадокс может быть связан с тем, что утрата NCS-1 частично компенсируется другими кальциевыми сенсорами: например, кальмодулином или белками семейства НКС. Действительно, NCS-1 регулирует множество мишеней, общих с кальмодулином, кальневроном-1, белками KChIP и некоторыми другими Ca^{2+} -сенсорами [231]. В то же время NCS-1 обладает и набором уникальных функций, которые реализуются за счет, во-первых, специфического диапазона его чувствительности к ионам кальция, во-вторых, его сигнально детерминированной клеточной и субклеточной локализации и, в-третьих, паттерна его экспрессии в тканях в процессе развития организма. Непосредственно регуляторная активность NCS-1 управляется за счет сложных механизмов мембранной ассоциации и узнавания сигнальных партнеров, которые основаны на конформационных свойствах белка. Последние регулируются за

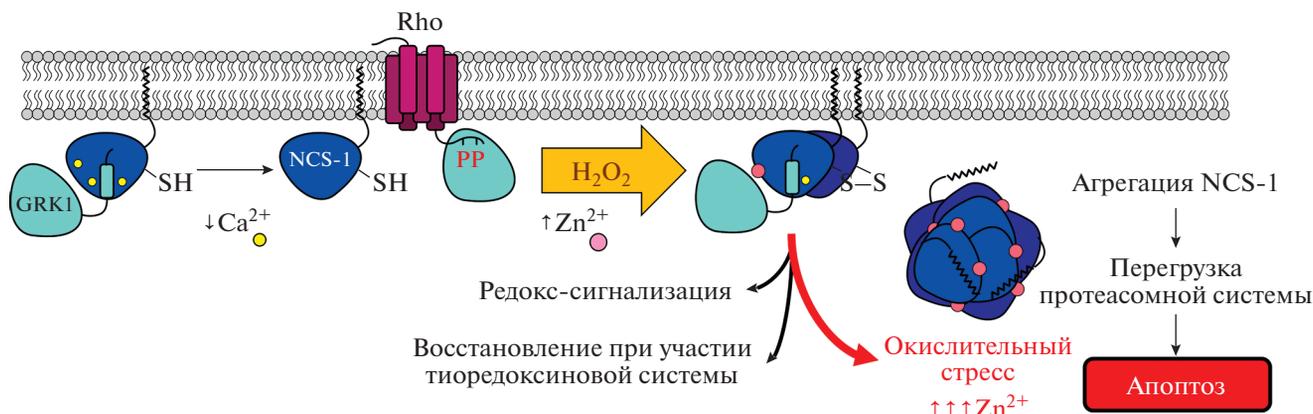


Рис. 6. Предполагаемый механизм редокс/ Zn^{2+} -зависимой регуляции NCS-1. При низких значениях редокс-потенциала среды NCS-1 (отмечен синим цветом), закрепленный на мембране за счет миристоильной группы, ингибирует протеинкиназу GRK (например, GRK1; отмечена голубым цветом) при высоком уровне кальция (отмечен желтым цветом) и высвобождает фермент при низком уровне кальция, тем самым инициируя фосфорилирование (десенситизацию) соответствующего GPCR (например, родопсина; отмечен сиреневым цветом). Умеренное повышение редокс-потенциала среды, сопровождаемое увеличением уровня мобильного цинка (отмечен розовым цветом), стимулирует дисульфидную димеризацию NCS-1 и индуцирует конститутивное ингибирование им протеинкиназы GRK. Этот процесс можно рассматривать как элемент редокс-регуляции, поскольку образование dNCS-1 обратимо за счет действия тиоредоксиновой системы. В условиях выраженного окислительного стресса и роста концентрации мобильного цинка происходит агрегация dNCS-1, что может вызывать апоптоз за счет перегрузки протеасомы и запуска ответа не-свернутых белков.

счет связывания внутриклеточных лигандов, в первую очередь ионов металлов (кальция, магния и цинка) и фосфолипидов мембраны, и чувствительны к изменениям внешних условий, таких как редокс-потенциал внутриклеточной среды. Многообразие факторов, оказывающих влияние на работу NCS-1, позволяет ему выступать в роли узлового компонента (“хаба”), на который завязано сразу несколько сигнальных путей и который может функционировать в условиях, когда другие механизмы регуляции недоступны. Заметим, что aberrantная экспрессия NCS-1, некоторые мутации, а также недавно обнаруженные внешние факторы, такие как избыток свободного цинка и повышение редокс-потенциала среды, могут выступать в роли триггеров, запускающих “аварийную” активность этого белка, которая в том числе обеспечивает переключение между сигналами на выживание и гибель нервных клеток. Выявление С-концевого сегмента — уникального среди белков НКК специфического элемента структуры NCS-1, регулирующего доступ к сайтам связывания его мишеней, — относится к важнейшим достижениям многолетних структурных исследований описанного здесь белка. Теперь селективное таргетирование С-концевой области можно рассматривать как перспективный подход к терапии нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с aberrantной активностью NCS-1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 21-15-00123).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pongs O., Krah-Jentgens I., Engelkamp D., Ferras A. (1991) Sequence and possible function of a novel Ca^{2+} -binding protein encoded in the *Shaker*-locus of *Drosophila*. In: *Novel Calcium-Binding Proteins: Fundamentals and Clinical Implications*. Ed. Heizmann C.W. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 497–503.
2. Persechini A., Moncrief N.D., Kretsinger R.H. (1989) The EF-hand family of calcium-modulated proteins. *Trends Neurosci.* **12**(11), 462–467.
3. Pongs O., Lindemeier J., Zhu X.R., Theil T., Engelkamp D., Krah-Jentgens I., Lambrecht H.G., Koch K.W., Schwemer J., Rivosecchi R., et al. (1993) Frequenin — a novel calcium-binding protein that modulates synaptic efficacy in the *Drosophila* nervous system. *Neuron.* **11**(1), 15–28.
4. Kawamura S. (1994) Photoreceptor light-adaptation mediated by S-modulin, a member of a possible regulatory protein family of protein phosphorylation in signal transduction. *Neurosci. Res.* **20**(4), 293–298.
5. De Castro E., Nef S., Fiumelli H., Lenz S.E., Kawamura S., Nef P. (1995) Regulation of rhodopsin phosphorylation by a family of neuronal calcium sen-

- sors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**(1), 133–140.
6. Olafsson P., Soares H.D., Herzog K.H., Wang T., Morgan J.I., Lu B. (1997) The Ca²⁺ binding protein, frequenin is a nervous system-specific protein in mouse preferentially localized in neurites. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **44**(1), 73–82.
 7. Chen C., Yu L., Zhang P., Jiang J., Zhang Y., Chen X., Wu Q., Wu Q., Zhao S. (2002) Human neuronal calcium sensor-1 shows the highest expression level in cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* **319**(2), 67–70.
 8. Blasiolo B., Kabbani N., Boehmler W., Thisse B., Thisse C., Canfield V., Levenson R. (2005) Neuronal calcium sensor-1 gene *nsc-1a* is essential for semicircular canal formation in zebrafish inner ear. *J. Neurobiol.* **64**(3), 285–297.
 9. Msghina M., Govind C.K., Atwood H.L. (1998) Synaptic structure and transmitter release in crustacean phasic and tonic motor neurons. *J. Neurosci.* **18**(4), 1374–1382.
 10. Dyer J.R., Sossin W.S., Klein M. (1996) Cloning and characterization of aplycalcin and *Aplysia* neurocalcin, two new members of the calmodulin superfamily of small calcium-binding proteins. *J. Neurochem.* **67**(3), 932–942.
 11. Nef S., Fiumelli H., de Castro E., Raes M.B., Nef P. (1995) Identification of neuronal calcium sensor (NCS-1) possibly involved in the regulation of receptor phosphorylation. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **15**(1–4), 365–378.
 12. Olafsson P., Wang T., Lu B. (1995) Molecular cloning and functional characterization of the *Xenopus* Ca²⁺-binding protein frequenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**(17), 8001–8005.
 13. Hendricks K.B., Wang B.Q., Schnieders E.A., Thorner J. (1999) Yeast homologue of neuronal frequenin is a regulator of phosphatidylinositol-4-OH kinase. *Nat. Cell Biol.* **1**(4), 234–241.
 14. Hamasaki-Katagiri N., Molchanova T., Takeda K., Ames J.B. (2004) Fission yeast homolog of neuronal calcium sensor-1 (Ncs1p) regulates sporulation and confers calcium tolerance. *J. Biol. Chem.* **279**(13), 12744–12754.
 15. Sanchez-Barrena M.J., Martinez-Ripoll M., Zhu J.K., Albert A. (2004) SOS3 (salt overly sensitive 3) from *Arabidopsis thaliana*: expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**(Pt. 7), 1272–1274.
 16. Nagae M., Nozawa A., Koizumi N., Sano H., Hashimoto H., Sato M., Shimizu T. (2003) The crystal structure of the novel calcium-binding protein AtCBL2 from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **278**(43), 42240–42246.
 17. Strahl T., Grafelmann B., Dannenberg J., Thorner J., Pongs O. (2003) Conservation of regulatory function in calcium-binding proteins: human frequenin (neuronal calcium sensor-1) associates productively with yeast phosphatidylinositol 4-kinase isoform, Pik1. *J. Biol. Chem.* **278**(49), 49589–49599.
 18. Bourne Y., Dannenberg J., Pollmann V., Marchot P., Pongs O. (2001) Immunocytochemical localization and crystal structure of human frequenin (neuronal calcium sensor 1). *J. Biol. Chem.* **276**(15), 11949–11955.
 19. Magno L.A.V., Tenza-Ferrer H., Collodetti M., Nicolau E.S., Khlghatyan J., Del'Guidice T., Romano-Silva M.A., Beaulieu J.M. (2020) Contribution of neuronal calcium sensor 1 (Ncs-1) to anxiolytic-like and social behavior mediated by valproate and Gsk3 inhibition. *Sci. Rep.* **10**(1), 4566.
 20. Grosshans H.K., Fischer T.T., Steinle J.A., Brill A.L., Ehrlich B.E. (2020) Neuronal calcium sensor 1 is up-regulated in response to stress to promote cell survival and motility in cancer cells. *Mol. Oncol.* **14**(6), 1134–1151.
 21. Uchida A., Seki N., Mizuno K., Misono S., Yamada Y., Kikkawa N., Sanada H., Kumamoto T., Suetsugu T., Inoue H. (2019) Involvement of dual-strand of the miR-144 duplex and their targets in the pathogenesis of lung squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* **110**(1), 420–432.
 22. Zhou H., Yang C., Bai F., Ma Z., Wang J., Wang F., Li F., Wang Q., Xiong L. (2017) Electroacupuncture alleviates brain damage through targeting of neuronal calcium sensor 1 by miR-191a-5p after ischemic stroke. *Rejuvenation Res.* **20**(6), 492–505.
 23. Gerhard D.S., Wagner L., Feingold E.A., Shenmen C.M., Grouse L.H., Schuler G., Klein S.L., Old S., Rasooly R., Good P., Guyer M., Peck A.M., Derge J.G., Lipman D., Collins F.S., Jang W., Sherry S., Feolo M., Misquitta L., Lee E., Rotmistrovsky K., Greenhut S.F., Schaefer C.F., Buetow K., Bonner T.I., Haussler D., Kent J., Kiekhuis M., Furey T., Brent M., Prange C., Schreiber K., Shapiro N., Bhat N.K., Hopkins R.F., Hsie F., Driscoll T., Soares M.B., Casavant T.L., Scheetz T.E., Brownstein M.J., Usdin T.B., Toshiyuki S., Carninci P., Piao Y., Dudekula D.B., Ko M.S., Kawakami K., Suzuki Y., Sugano S., Gruber C.E., Smith M.R., Simmons B., Moore T., Waterman R., Johnson S.L., Ruan Y., Wei C.L., Mathavan S., Gunaratne P.H., Wu J., Garcia A.M., Hulyk S.W., Fuh E., Yuan Y., Sneed A., Kowis C., Hodgson A., Muzny D.M., McPherson J., Gibbs R.A., Fahey J., Helton E., Ketteman M., Madan A., Rodrigues S., Sanchez A., Whiting M., Madari A., Young A.C., Wetherby K.D., Granite S.J., Kwong P.N., Brinkley C.P., Pearson R.L., Bouffard G.G., Blakesly R.W., Green E.D., Dickson M.C., Rodriguez A.C., Grimwood J., Schmutz J., Myers R.M., Butterfield Y.S., Griffith M., Griffith O.L., Krzywinski M.I., Liao N., Morin R., Palmquist D., Petrescu A.S., Skalska U., Smailus D.E., Stott J.M., Schnerch A., Schein J.E., Jones S.J., Holt R.A., Baross A., Marra M.A., Clifton S., Makowski K.A., Bosak S., Malek J., Team M.G.C.P. (2004) The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome Res.* **14**(10B), 2121–2127.
 24. Wang B., Boeckel G.R., Huynh L., Nguyen L., Cao W., De La Cruz E.M., Kaftan E.J., Ehrlich B.E. (2016)

- Neuronal calcium sensor 1 has two variants with distinct calcium binding characteristics. *PLoS One*. **11**(8), e0161414.
25. Gierke P., Zhao C., Brackmann M., Linke B., Heine mann U., Braunewell K.H. (2004) Expression analysis of members of the neuronal calcium sensor protein family: combining bioinformatics and western blot analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**(1), 38–43.
 26. Schaad N.C., De Castro E., Nef S., Hegi S., Hinrichsen R., Martone M.E., Ellisman M.H., Sikkink R., Rusnak F., Sygush J., Nef P. (1996) Direct modulation of calmodulin targets by the neuronal calcium sensor NCS-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**(17), 9253–9258.
 27. Pitt J.C., Lindemeier J., Habbes H.W., Veh R.W. (1998) Haptenylation of antibodies during affinity purification: a novel and convenient procedure to obtain labeled antibodies for quantification and double labeling. *Histochem. Cell Biol.* **110**(3), 311–322.
 28. Martone M.E., Edelmann V.M., Ellisman M.H., Nef P. (1999) Cellular and subcellular distribution of the calcium-binding protein NCS-1 in the central nervous system of the rat. *Cell Tissue Res.* **295**(3), 395–407.
 29. Paterlini M., Revilla V., Grant A.L., Wisden W. (2000) Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain. *Neuroscience*. **99**(2), 205–216.
 30. Sage C., Venteo S., Jeromin A., Roder J., Dechesne C.J. (2000) Distribution of frequenin in the mouse inner ear during development, comparison with other calcium-binding proteins and synaptophysin. *Hear Res.* **150**(1–2), 70–82.
 31. Treloar H.B., Uboha U., Jeromin A., Greer C.A. (2005) Expression of the neuronal calcium sensor protein NCS-1 in the developing mouse olfactory pathway. *J. Comp. Neurol.* **482**(2), 201–216.
 32. Kawasaki T., Nishio T., Kurosawa H., Roder J., Jeromin A. (2003) Spatiotemporal distribution of neuronal calcium sensor-1 in the developing rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **460**(4), 465–475.
 33. Garcia N., Lanuza M.A., Besalduch N., Santafe M.M., Jeromin A., Tomas J. (2005) Localization of neuronal calcium sensor-1 at the adult and developing rat neuromuscular junction. *J. Neurosci. Res.* **82**(1), 1–9.
 34. Werle M.J., Roder J., Jeromin A. (2000) Expression of frequenin at the frog (*Rana*) neuromuscular junction, muscle spindle and nerve. *Neurosci. Lett.* **284**(1–2), 33–36.
 35. Lourenssen S., Jeromin A., Roder J., Blennerhassett M.G. (2002) Intestinal inflammation modulates expression of the synaptic vesicle protein neuronal calcium sensor-1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **282**(6), G1097–G1104.
 36. Averill S., Robson L.G., Jeromin A., Priestley J.V. (2004) Neuronal calcium sensor-1 is expressed by dorsal root ganglion cells, is axonally transported to central and peripheral terminals, and is concentrated at nodes. *Neuroscience*. **123**(2), 419–427.
 37. Taverna E., Francolini M., Jeromin A., Hilfiker S., Roder J., Rosa P. (2002) Neuronal calcium sensor 1 and phosphatidylinositol 4-OH kinase beta interact in neuronal cells and are translocated to membranes during nucleotide-evoked exocytosis. *J. Cell Sci.* **115**(Pt. 20), 3909–3922.
 38. Nakao S., Wakabayashi S., Nakamura T.Y. (2015) Stimulus-dependent regulation of nuclear Ca²⁺ signaling in cardiomyocytes: a role of neuronal calcium sensor-1. *PLoS One*. **10**(4), e0125050.
 39. Nakamura T.Y., Jeromin A., Mikoshiba K., Wakabayashi S. (2011) Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhancing Ca²⁺ signals. *Circ. Res.* **109**(5), 512–523.
 40. Ratai O., Hermainski J., Ravichandran K., Pongs O. (2019) NCS-1 deficiency is associated with obesity and diabetes type 2 in mice. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 78.
 41. Ng E., Varaschin R.K., Su P., Browne C.J., Hermainski J., Le Foll B., Pongs O., Liu F., Trudeau L.E., Roder J.C., Wong A.H. (2016) Neuronal calcium sensor-1 deletion in the mouse decreases motivation and dopamine release in the nucleus accumbens. *Behav. Brain Res.* **301**, 213–225.
 42. Mun H.S., Saab B.J., Ng E., McGirr A., Lipina T.V., Gondo Y., Georgiou J., Roder J.C. (2015) Self-directed exploration provides a Ncs1-dependent learning bonus. *Sci. Rep.* **5**, 17697.
 43. de Rezende V.B., Rosa D.V., Comim C.M., Magno L.A., Rodrigues A.L., Vidigal P., Jeromin A., Quevedo J., Romano-Silva M.A. (2014) NCS-1 deficiency causes anxiety and depressive-like behavior with impaired non-aversive memory in mice. *Physiol. Behav.* **130**, 91–98.
 44. Citri A., Malenka R.C. (2008) Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. **33**(1), 18–41.
 45. Jinno S., Jeromin A., Roder J., Kosaka T. (2002) Immunocytochemical localization of neuronal calcium sensor-1 in the hippocampus and cerebellum of the mouse, with special reference to presynaptic terminals. *Neuroscience*. **113**(2), 449–461.
 46. Goncalves J.T., Schafer S.T., Gage F.H. (2016) Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *Cell*. **167**(4), 897–914.
 47. Genin A., Davis S., Meziane H., Doyere V., Jeromin A., Roder J., Mallet J., Laroche S. (2001) Regulated expression of the neuronal calcium sensor-1 gene during long-term potentiation in the dentate gyrus *in vivo*. *Neuroscience*. **106**(3), 571–577.
 48. Saab B.J., Georgiou J., Nath A., Lee F.J., Wang M., Michalon A., Liu F., Mansuy I.M., Roder J.C. (2009) NCS-1 in the dentate gyrus promotes exploration, synaptic plasticity, and rapid acquisition of spatial memory. *Neuron*. **63**(5), 643–656.
 49. Kesner R.P., Lee I., Gilbert P. (2004) A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev. Neurosci.* **15**(5), 333–351.
 50. Sippy T., Cruz-Martin A., Jeromin A., Schweizer F.E. (2003) Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat. Neurosci.* **6**(10), 1031–1038.

51. Zucker R.S. (2003) NCS-1 stirs somnolent synapses. *Nat. Neurosci.* **6**(10), 1006–1008.
52. Jo J., Heon S., Kim M.J., Son G.H., Park Y., Henley J.M., Weiss J.L., Sheng M., Collingridge G.L., Cho K. (2008) Metabotropic glutamate receptor-mediated LTD involves two interacting Ca^{2+} sensors, NCS-1 and PICK1. *Neuron*. **60**(6), 1095–1111.
53. Brackmann M., Zhao C., Kuhl D., Manahan-Vaughan D., Braunewell K.H. (2004) MGluRs regulate the expression of neuronal calcium sensor proteins NCS-1 and VILIP-1 and the immediate early gene *arg3.1/arc* in the hippocampus *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**(3), 1073–1079.
54. Hanley J.G., Henley J.M. (2005) PICK1 is a calcium-sensor for NMDA-induced AMPA receptor trafficking. *EMBO J.* **24**(18), 3266–3278.
55. Hansel C., Linden D.J., D'Angelo E. (2001) Beyond parallel fiber LTD: the diversity of synaptic and non-synaptic plasticity in the cerebellum. *Nat. Neurosci.* **4**(5), 467–475.
56. Jinno S., Jeromin A., Roder J., Kosaka T. (2003) Compartmentation of the mouse cerebellar cortex by neuronal calcium sensor-1. *J. Comp. Neurol.* **458**(4), 412–424.
57. Drumond L.E., Mourao F.A., Leite H.R., Abreu R.V., Reis H.J., Moraes M.F., Pereira G.S., Massensini A.R. (2012) Differential effects of swimming training on neuronal calcium sensor-1 expression in rat hippocampus/cortex and in object recognition memory tasks. *Brain Res. Bull.* **88**(4), 385–391.
58. Nakamura T.Y., Nakao S., Nakajo Y., Takahashi J.C., Wakabayashi S., Yanamoto H. (2017) Possible signaling pathways mediating neuronal calcium sensor-1-dependent spatial learning and memory in mice. *PLoS One.* **12**(1), e0170829.
59. Nakamura T.Y., Sturm E., Pountney D.J., Orenzoff B., Artman M., Coetzee W.A. (2003) Developmental expression of NCS-1 (frequenin), a regulator of Kv4 K^+ channels, in mouse heart. *Pediatr. Res.* **53**(4), 554–557.
60. Bergmann M., Grabs D., Roder J., Rager G., Jeromin A. (2002) Differential expression of neuronal calcium sensor-1 in the developing chick retina. *J. Comp. Neurol.* **449**(3), 231–240.
61. Reynolds A.J., Bartlett S.E., Morgans C. (2001). The distribution of neuronal calcium sensor-1 protein in the developing and adult rat retina. *Neuroreport.* **12**(4), 725–728.
62. Chen X.L., Zhong Z.G., Yokoyama S., Bark C., Meister B., Berggren P.O., Roder J., Higashida H., Jeromin A. (2001) Overexpression of rat neuronal calcium sensor-1 in rodent NG108-15 cells enhances synapse formation and transmission. *J. Physiol.* **532**(Pt. 3), 649–659.
63. Hui H., McHugh D., Hannan M., Zeng F., Xu S.Z., Khan S.U., Levenson R., Beech D.J., Weiss J.L. (2006) Calcium-sensing mechanism in TRPC5 channels contributing to retardation of neurite outgrowth. *J. Physiol.* **572**(Pt. 1), 165–172.
64. Scalettar B.A., Rosa P., Taverna E., Francolini M., Tsuboi T., Terakawa S., Koizumi S., Roder J., Jeromin A. (2002). Neuronal calcium sensor-1 binds to regulated secretory organelles and functions in basal and stimulated exocytosis in PC12 cells. *J. Cell Sci.* **115**(Pt. 11), 2399–2412.
65. Pan C.Y., Jeromin A., Lundstrom K., Yoo S.H., Roder J., Fox A.P. (2002) Alterations in exocytosis induced by neuronal Ca^{2+} sensor-1 in bovine chromaffin cells. *J. Neurosci.* **22**(7), 2427–2433.
66. McFerran B.W., Graham M.E., Burgoyne R.D. (1998) Neuronal Ca^{2+} sensor 1, the mammalian homologue of frequenin, is expressed in chromaffin and PC12 cells and regulates neurosecretion from dense-core granules. *J. Biol. Chem.* **273**(35), 22768–22772.
67. Guild S.B., Murray A.T., Wilson M.L., Wiegand U.K., Apps D.K., Jin Y., Rindler M., Roder J., Jeromin A. (2001). Over-expression of NCS-1 in AtT-20 cells affects ACTH secretion and storage. *Mol. Cell Endocrinol.* **184**(1–2), 51–63.
68. McFerran B.W., Weiss J.L., Burgoyne R.D. (1999) Neuronal Ca^{2+} sensor 1. Characterization of the myristoylated protein, its cellular effects in permeabilized adrenal chromaffin cells, Ca^{2+} -independent membrane association, and interaction with binding proteins, suggesting a role in rapid Ca^{2+} signal transduction. *J. Biol. Chem.* **274**(42), 30258–30265.
69. Gromada J., Bark C., Smidt K., Efanov A.M., Janson J., Mandic S.A., Webb D.L., Zhang W., Meister B., Jeromin A., Berggren P.O. (2005) Neuronal calcium sensor-1 potentiates glucose-dependent exocytosis in pancreatic β cells through activation of phosphatidylinositol 4-kinase β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**(29), 10303–10308.
70. Kapp-Barnea Y., Melnikov S., Shefler I., Jeromin A., Sagi-Eisenberg R. (2003) Neuronal calcium sensor-1 and phosphatidylinositol 4-kinase β regulate IgE receptor-triggered exocytosis in cultured mast cells. *J. Immunol.* **171**(10), 5320–5327.
71. Mora S., Durham P.L., Smith J.R., Russo A.F., Jeromin A., Pessin J.E. (2002) NCS-1 inhibits insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3L1 adipocytes through a phosphatidylinositol 4-kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **277**(30), 27494–27500.
72. Zhao X., Varnai P., Tuymetova G., Balla A., Toth Z.E., Oker-Blom C., Roder J., Jeromin A., Balla T. (2001) Interaction of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) with phosphatidylinositol 4-kinase β stimulates lipid kinase activity and affects membrane trafficking in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* **276**(43), 40183–40189.
73. Weisz O.A., Gibson G.A., Leung S.M., Roder J., Jeromin A. (2000) Overexpression of frequenin, a modulator of phosphatidylinositol 4-kinase, inhibits biosynthetic delivery of an apical protein in polarized madin-darby canine kidney cells. *J. Biol. Chem.* **275**(32), 24341–24347.
74. de Barry J., Janoshazi A., Dupont J.L., Procksch O., Chasserot-Golaz S., Jeromin A., Vitale N. (2006) Functional implication of neuronal calcium sensor-1

- and phosphoinositol 4-kinase- β interaction in regulated exocytosis of PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **281**(26), 18098–18111.
75. Rajebhosale M., Greenwood S., Vidugiriene J., Jeromin A., Hilfiker S. (2003) Phosphatidylinositol 4-OH kinase is a downstream target of neuronal calcium sensor-1 in enhancing exocytosis in neuroendocrine cells. *J. Biol. Chem.* **278**(8), 6075–6084.
 76. Koizumi S., Rosa P., Willars G.B., Challiss R.A., Taverna E., Francolini M., Bootman M.D., Lipp P., Inoue K., Roder J., Jeromin A. (2002) Mechanisms underlying the neuronal calcium sensor-1-evoked enhancement of exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **277**(33), 30315–30324.
 77. Bartlett S.E., Reynolds A.J., Weible M., Jeromin A., Roder J., Hendry I.A. (2000) PtdIns 4-kinase β and neuronal calcium sensor-1 co-localize but may not directly associate in mammalian neurons. *J. Neurosci. Res.* **62**(2), 216–224.
 78. Zheng Q., Bobich J.A., Vidugiriene J., McFadden S.C., Thomas F., Roder J., Jeromin A. (2005) Neuronal calcium sensor-1 facilitates neuronal exocytosis through phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Neurochem.* **92**(3), 442–451.
 79. Uzureau S., Lecordier L., Uzureau P., Hennig D., Graversen J.H., Homble F., Mfutu P.E., Oliveira Arcolino F., Ramos A.R., La Rovere R.M., Luyten T., Vermeersch M., Tebabi P., Dieu M., Cuypers B., Deborggraeve S., Rabant M., Legendre C., Moestrup S.K., Levtchenko E., Bultynck G., Erneux C., Perez-Morga D., Pays E. (2020) APOL1 C-terminal variants may trigger kidney disease through interference with APOL3 control of actomyosin. *Cell Rep.* **30**(11), 3821–3836.e13.
 80. Mikhaylova M., Reddy P.P., Munsch T., Landgraf P., Suman S.K., Smalla K.H., Gundelfinger E.D., Sharma Y., Kreutz M.R. (2009) Calneurons provide a calcium threshold for trans-Golgi network to plasma membrane trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**(22), 9093–9098.
 81. Petko J.A., Kabbani N., Frey C., Woll M., Hickey K., Craig M., Canfield V.A., Levenson R. (2009) Proteomic and functional analysis of NCS-1 binding proteins reveals novel signaling pathways required for inner ear development in zebrafish. *BMC Neurosci.* **10**, 27.
 82. Haynes L.P., Sherwood M.W., Dolman N.J., Burgoyne R.D. (2007) Specificity, promiscuity and localization of ARF protein interactions with NCS-1 and phosphatidylinositol-4 kinase-III β . *Traffic.* **8**(8), 1080–1092.
 83. Haynes L.P., Fitzgerald D.J., Wareing B., O'Callaghan D.W., Morgan A., Burgoyne R.D. (2006) Analysis of the interacting partners of the neuronal calcium-binding proteins L-CaBP1, hippocalcin, NCS-1 and neurocalcin δ . *Proteomics.* **6**(6), 1822–1832.
 84. Haynes L.P., Thomas G.M., Burgoyne R.D. (2005) Interaction of neuronal calcium sensor-1 and ADP-ribosylation factor 1 allows bidirectional control of phosphatidylinositol 4-kinase β and *trans*-Golgi network-plasma membrane traffic. *J. Biol. Chem.* **280**(7), 6047–6054.
 85. Kabbani N., Negyessy L., Lin R., Goldman-Rakic P., Levenson R. (2002) Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J. Neurosci.* **22**(19), 8476–8486.
 86. Bergson C., Levenson R., Goldman-Rakic P.S., Lidow M.S. (2003) Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca²⁺ connection in dopamine signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**(9), 486–492.
 87. Evron T., Daigle T.L., Caron M.G. (2012) GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization. *Trends Pharmacol. Sci.* **33**(3), 154–164.
 88. Ferre S., Casado V., Devi L.A., Filizola M., Jockers R., Lohse M.J., Milligan G., Pin J.P., Guitart X. (2014) G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol. Rev.* **66**(2), 413–434.
 89. Navarro G., Aguinaga D., Moreno E., Hradsky J., Reddy P.P., Cortes A., Mallol J., Casado V., Mikhaylova M., Kreutz M.R., Lluís C., Canela E.I., McCormick P.J., Ferre S. (2014) Intracellular calcium levels determine differential modulation of allosteric interactions within G protein-coupled receptor heteromers. *Chem. Biol.* **21**(11), 1546–1556.
 90. Negyessy L., Goldman-Rakic P.S. (2005) Subcellular localization of the dopamine D2 receptor and coexistence with the calcium-binding protein neuronal calcium sensor-1 in the primate prefrontal cortex. *J. Comp. Neurol.* **488**(4), 464–475.
 91. Guimaraes M.M., Reis H.J., Guimaraes L.P., Carneiro D.S., Ribeiro F.M., Gomez M.V., Jeromin A., Romano-Silva M.A. (2009) Modulation of muscarinic signaling in PC12 cells overexpressing neuronal Ca²⁺ sensor-1 protein. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **55**(Suppl.), OL1138–50.
 92. Angelats E., Requesens M., Aguinaga D., Kreutz M.R., Franco R., Navarro G. (2018) Neuronal calcium and cAMP cross-talk mediated by cannabinoid CB1 receptor and EF-hand calcium sensor interactions. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, 67.
 93. Navarro G., Hradsky J., Lluís C., Casado V., McCormick P.J., Kreutz M.R., Mikhaylova M. (2012) NCS-1 associates with adenosine A(2A) receptors and modulates receptor function. *Front. Mol. Neurosci.* **5**, 53.
 94. Gurevich E.V., Tesmer J.J., Mushegian A., Gurevich V.V. (2012) G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. *Pharmacol. Ther.* **133**(1), 40–69.
 95. Pitcher J.A., Fredericks Z.L., Stone W.C., Premont R.T., Stoffel R.H., Koch W.J., Lefkowitz R.J. (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies. *J. Biol. Chem.* **271**(40), 24907–24913.
 96. Serodio P., Rudy B. (1998) Differential expression of Kv4 K⁺ channel subunits mediating subthreshold

- transient K⁺ (A-type) currents in rat brain. *J. Neurophysiol.* **79**(2), 1081–1091.
97. Nakamura T.Y., Pountney D.J., Ozaita A., Nandi S., Ueda S., Rudy B., Coetzee W.A. (2001) A role for frequenin, a Ca²⁺-binding protein, as a regulator of Kv4 K⁺-currents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**(22), 12808–12813.
 98. Guo W., Malin S.A., Johns D.C., Jeromin A., Nerbonne J.M. (2002) Modulation of Kv4-encoded K⁺ currents in the mammalian myocardium by neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Chem.* **277**(29), 26436–26443.
 99. Zaika O., Tolstykh G.P., Jaffe D.B., Shapiro M.S. (2007) Inositol triphosphate-mediated Ca²⁺ signals direct purinergic P2Y receptor regulation of neuronal ion channels. *J. Neurosci.* **27**(33), 8914–8926.
 100. Winks J.S., Hughes S., Filippov A.K., Tatulian L., Abogadie F.C., Brown D.A., Marsh S.J. (2005) Relationship between membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and receptor-mediated inhibition of native neuronal M channels. *J. Neurosci.* **25**(13), 3400–3413.
 101. Xiao L., Koopmann T.T., Ordog B., Postema P.G., Verkerk A.O., Iyer V., Sampson K.J., Boink G.J., Mamarbachi M.A., Varro A., Jordaens L., Res J., Kass R.S., Wilde A.A., Bezzina C.R., Nattel S. (2013) Unique cardiac Purkinje fiber transient outward current β -subunit composition: a potential molecular link to idiopathic ventricular fibrillation. *Circ. Res.* **112**(10), 1310–1322.
 102. Weiss J.L., Archer D.A., Burgoyne R.D. (2000) Neuronal Ca²⁺ sensor-1/frequenin functions in an autocrine pathway regulating Ca²⁺ channels in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **275**(51), 40082–40087.
 103. Weiss J.L., Burgoyne R.D. (2001) Voltage-independent inhibition of P/Q-type Ca²⁺ channels in adrenal chromaffin cells via a neuronal Ca²⁺ sensor-1-dependent pathway involves Src family tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **276**(48), 44804–44811.
 104. Rousset M., Cens T., Gavarini S., Jeromin A., Charner P. (2003) Down-regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by neuronal calcium sensor-1 is β subunit-specific. *J. Biol. Chem.* **278**(9), 7019–7026.
 105. Scott V.E., De Waard M., Liu H., Gurnett C.A., Venzke D.P., Lennon V.A., Campbell K.P. (1996) β subunit heterogeneity in N-type Ca²⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **271**(6), 3207–3212.
 106. Tsujimoto T., Jeromin A., Saitoh N., Roder J.C., Takahashi T. (2002) Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. *Science.* **295**(5563), 2276–2279.
 107. Wang C.Y., Yang F., He X., Chow A., Du J., Russell J.T., Lu B. (2001) Ca²⁺-binding protein frequenin mediates GDNF-induced potentiation of Ca²⁺ channels and transmitter release. *Neuron.* **32**(1), 99–112.
 108. Yan J., Leal K., Magupalli V.G., Nanou E., Martinez G.Q., Scheuer T., Catterall W.A. (2014) Modulation of Cav2.1 channels by neuronal calcium sensor-1 induces short-term synaptic facilitation. *Mol. Cell Neurosci.* **63**, 124–131.
 109. Lian L.Y., Pandalaneni S.R., Todd P.A., Martin V.M., Burgoyne R.D., Haynes L.P. (2014) Demonstration of binding of neuronal calcium sensor-1 to the Cav2.1 P/Q-type calcium channel. *Biochemistry.* **53**(38), 6052–6062.
 110. Schlecker C., Boehmerle W., Jeromin A., DeGray B., Varshney A., Sharma Y., Szigeti-Buck K., Ehrlich B.E. (2006) Neuronal calcium sensor-1 enhancement of InsP3 receptor activity is inhibited by therapeutic levels of lithium. *J. Clin. Invest.* **116**(6), 1668–1674.
 111. Iketani M., Imaizumi C., Nakamura F., Jeromin A., Mikoshiba K., Goshima Y., Takei K. (2009) Regulation of neurite outgrowth mediated by neuronal calcium sensor-1 and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in nerve growth cones. *Neuroscience.* **161**(3), 743–752.
 112. De Raad S., Comte M., Nef P., Lenz S.E., Gundelfinger E.D., Cox J.A. (1995) Distribution pattern of three neuronal calcium-binding proteins (NCS-1, VILIP and recoverin) in chicken, bovine and rat retina. *Histochem. J.* **27**(7), 524–535.
 113. Vladimirov V.I., Zernii E.Y., Baksheeva V.E., Wimmerberg H., Kazakov A.S., Tikhomirova N.K., Nemashkalova E.L., Mitkevich V.A., Zamyatnin A.A., Jr., Lipkin V.M., Philippov P.P., Permyakov S.E., Senin I.I., Koch K.W., Zinchenko D.V. (2018) Photoreceptor calcium sensor proteins in detergent-resistant membrane rafts are regulated via binding to caveolin-1. *Cell Calcium.* **73**, 55–69.
 114. Baksheeva V.E., Nazipova A.A., Zinchenko D.V., Serebryakova M.V., Senin I.I., Permyakov S.E., Philippov P.P., Li Y., Zamyatnin A.A., Zernii E.Y., Aliev G. (2015) Ca²⁺-myristoyl switch in neuronal calcium sensor-1: a role of C-terminal segment. *CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.* **14**(4), 437–451.
 115. Koch K.W., Dell’Orco D. (2015) Protein and signaling networks in vertebrate photoreceptor cells. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 67.
 116. Pandalaneni S., Karupiah V., Saleem M., Haynes L.P., Burgoyne R.D., Mayans O., Derrick J.P., Lian L.Y. (2015) Neuronal calcium sensor-1 binds the D2 dopamine receptor and G-protein-coupled receptor kinase 1 (GRK1) peptides using different modes of interactions. *J. Biol. Chem.* **290**(30), 18744–18756.
 117. Fik-Rymarkiewicz E., Duda T., Sharma R.K. (2006) Novel frequenin-modulated Ca²⁺-signaling membrane guanylate cyclase (ROS-GC) transduction pathway in bovine hippocampus. *Mol. Cell Biochem.* **291**(1–2), 187–204.
 118. Butler M.R., Ma H., Yang F., Belcher J., Le Y.Z., Mikoshiba K., Biel M., Michalakis S., Iuso A., Krizaj D., Ding X.Q. (2017) Endoplasmic reticulum (ER) Ca²⁺-channel activity contributes to ER stress and cone death in cyclic nucleotide-gated channel deficiency. *J. Biol. Chem.* **292**(27), 11189–11205.

119. de Almeida Gomes C.P., Ventura A.L. (2004) Localization of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) in the avian retina. *Brain Res. Bull.* **63**(6), 499–507.
120. Ma H., Butler M.R., Thapa A., Belcher J., Yang F., Baehr W., Biel M., Michalakis S., Ding X.Q. (2015) cGMP/Protein kinase G signaling suppresses inositol 1,4,5-trisphosphate receptor phosphorylation and promotes endoplasmic reticulum stress in photoreceptors of cyclic nucleotide-gated channel-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **290**(34), 20880–20892.
121. Van Hook M.J., Nawy S., Thoreson W.B. (2019) Voltage- and calcium-gated ion channels of neurons in the vertebrate retina. *Prog. Retin Eye Res.* **72**, 100760.
122. Stella S.L., Jr., Bryson E.J., Thoreson W.B. (2002) A2 adenosine receptors inhibit calcium influx through L-type calcium channels in rod photoreceptors of the salamander retina. *J. Neurophysiol.* **87**(1), 351–360.
123. Nakamura T.Y., Jeromin A., Smith G., Kurushima H., Koga H., Nakabeppu Y., Wakabayashi S., Nabekura J. (2006) Novel role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J. Cell Biol.* **172**(7), 1081–1091.
124. Soler R.M., Dolcet X., Encinas M., Egea J., Bayascas J.R., Comella J.X. (1999) Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *J. Neurosci.* **19**(21), 9160–9169.
125. Yip P.K., Wong L.F., Sears T.A., Yanez-Munoz R.J., McMahon S.B. (2010) Cortical overexpression of neuronal calcium sensor-1 induces functional plasticity in spinal cord following unilateral pyramidal tract injury in rat. *PLoS Biol.* **8**(6), e1000399.
126. Angebault C., Fauconnier J., Patergnani S., Rieusset J., Danese A., Affortit C.A., Jagodzinska J., Megy C., Quiles M., Cazevielle C., Korchagina J., Bonnet-Wersinger D., Milea D., Hamel C., Pinton P., Thiry M., Lacampagne A., Delprat B., Delettre C. (2018) ER-mitochondria cross-talk is regulated by the Ca²⁺ sensor NCS1 and is impaired in Wolfram syndrome. *Sci. Signal.* **11**(553), eaaq1380.
127. Nguyen L.D., Fischer T.T., Abreu D., Arroyo A., Urano F., Ehrlich B.E. (2020) Calpain inhibitor and ibudilast rescue β cell functions in a cellular model of Wolfram syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **117**(29), 17389–17398.
128. Wilkinson B.L., Jeromin A., Roder J., Hyson R.L. (2003) Activity-dependent regulation of the subcellular localization of neuronal calcium sensor-1 in the avian cochlear nucleus. *Neuroscience.* **117**(4), 957–964.
129. Warchol M.E., Dallos P. (1990) Neural coding in the chick cochlear nucleus. *J. Comp. Physiol. A.* **166**(5), 721–734.
130. Benkert J., Hess S., Roy S., Beccano-Kelly D., Wiederspohn N., Duda J., Simons C., Patil K., Gaifullina A., Mannel N., Dragicevic E., Spaich D., Muller S., Nemeth J., Hollmann H., Deuter N., Mousba Y., Kubisch C., Poetschke C., Striessnig J., Pongs O., Schneider T., Wade-Martins R., Patel S., Parlato R., Frank T., Kloppenburg P., Liss B. (2019) Cav2.3 channels contribute to dopaminergic neuron loss in a model of Parkinson's disease. *Nat. Commun.* **10**(1), 5094.
131. Wang D., O'Halloran D., Goodman M.B. (2013) GCY-8, PDE-2, and NCS-1 are critical elements of the cGMP-dependent thermotransduction cascade in the AFD neurons responsible for *C. elegans* thermotaxis. *J. Gen. Physiol.* **142**(4), 437–449.
132. Murakami H., Bessinger K., Hellmann J., Murakami S. (2005) Aging-dependent and -independent modulation of associative learning behavior by insulin/insulin-like growth factor-1 signal in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **25**(47), 10894–10904.
133. Nakamura T.Y., Nakao S., Wakabayashi S. (2016) Neuronal Ca²⁺ sensor-1 contributes to stress tolerance in cardiomyocytes via activation of mitochondrial detoxification pathways. *J. Mol. Cell Cardiol.* **99**, 23–34.
134. Terao R., Honjo M., Ueta T., Obinata H., Izumi T., Kurano M., Yatomi Y., Koso H., Watanabe S., Aihara M. (2019) Light stress-induced increase of sphingosine 1-phosphate in photoreceptors and its relevance to retinal degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(15), 3670.
135. McDougald D.S., Papp T.E., Zezulin A.U., Zhou S., Bennett J. (2019) *AKT3* gene transfer promotes anabolic reprogramming and photoreceptor neuroprotection in a pre-clinical model of retinitis pigmentosa. *Mol. Ther.* **27**(7), 1313–1326.
136. Braunewell K.H. (2005) The darker side of Ca²⁺ signaling by neuronal Ca²⁺-sensor proteins: from Alzheimer's disease to cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**(7), 345–351.
137. Bandura J., Feng Z.P. (2019) Current understanding of the role of neuronal calcium sensor 1 in neurological disorders. *Mol. Neurobiol.* **56**(9), 6080–6094.
138. Boeckel G.R., Ehrlich B.E. (2018) NCS-1 is a regulator of calcium signaling in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1865**(11 Pt B), 1660–1667.
139. Koh P.O., Undie A.S., Kabbani N., Levenson R., Goldman-Rakic P.S., Lidow M.S. (2003) Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**(1), 313–317.
140. Bai J., He F., Novikova S.I., Undie A.S., Dracheva S., Haroutunian V., Lidow M.S. (2004) Abnormalities in the dopamine system in schizophrenia may lie in altered levels of dopamine receptor-interacting proteins. *Biol. Psychiatry.* **56**(6), 427–440.
141. Souza B.R., Torres K.C., Miranda D.M., Motta B.S., Caetano F.S., Rosa D.V., Souza R.P., Giovani A., Jr., Carneiro D.S., Guimaraes M.M., Martins-Silva C., Reis H.J., Gomez M.V., Jeromin A., Romano-Silva M.A. (2011) Downregulation of the cAMP/PKA pathway in PC12 cells overexpressing NCS-1. *Cell Mol. Neurobiol.* **31**(1), 135–143.
142. Souza B.R., Souza R.P., Rosa D.V., Guimaraes M.M., Correa H., Romano-Silva M.A. (2006) Dopaminergic

- intracellular signal integrating proteins: relevance to schizophrenia. *Dialogues Clin. Neurosci.* **8**(1), 95–100.
143. Harvey A.G., Talbot L.S., Gershon A. (2009) Sleep disturbance in bipolar disorder across the lifespan. *Clin. Psychol.* (New York). **16**(2), 256–277.
 144. D’Onofrio S., Kezunovic N., Hyde J.R., Luster B., Messias E., Urbano F.J., Garcia-Rill E. (2015) Modulation of gamma oscillations in the pedunculopontine nucleus by neuronal calcium sensor protein-1: relevance to schizophrenia and bipolar disorder. *J. Neurophysiol.* **113**(3), 709–719.
 145. Garcia-Rill E., D’Onofrio S., Mahaffey S.C., Bisagno V., Urbano F.J. (2019) Bottom-up gamma and bipolar disorder, clinical and neuroepigenetic implications. *Bipolar. Disord.* **21**(2), 108–116.
 146. Jiang X., Lautermilch N.J., Watari H., Westenbroek R.E., Scheuer T., Catterall W.A. (2008) Modulation of CaV2.1 channels by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**(1), 341–346.
 147. D’Onofrio S., Hyde J., Garcia-Rill E. (2017) Interaction between neuronal calcium sensor protein 1 and lithium in pedunculopontine neurons. *Physiol. Rep.* **5**(7), e13246.
 148. D’Onofrio S., Urbano F.J., Messias E., Garcia-Rill E. (2016) Lithium decreases the effects of neuronal calcium sensor protein 1 in pedunculopontine neurons. *Physiol. Rep.* **4**(6), e12740.
 149. Souza B.R., Torres K.C., Miranda D.M., Motta B.S., Scotti-Muzzi E., Guimaraes M.M., Carneiro D.S., Rosa D.V., Souza R.P., Reis H.J., Jeromin A., Romano-Silva M.A. (2010) Lack of effects of typical and atypical antipsychotics in DARPP-32 and NCS-1 levels in PC12 cells overexpressing NCS-1. *J. Negat. Results Biomed.* **9**, 4.
 150. Souza B.R., Motta B.S., Rosa D.V., Torres K.C., Castro A.A., Comim C.M., Sampaio A.M., Lima F.F., Jeromin A., Quevedo J., Romano-Silva M.A. (2008) DARPP-32 and NCS-1 expression is not altered in brains of rats treated with typical or atypical antipsychotics. *Neurochem. Res.* **33**(3), 533–538.
 151. Kabbani N., Levenson R. (2006) Antipsychotic-induced alterations in D2 dopamine receptor interacting proteins within the cortex. *Neuroreport.* **17**(3), 299–301.
 152. Muralidhar D., Kunjachen Jobby M., Jeromin A., Roder J., Thomas F., Sharma Y. (2004) Calcium and chlorpromazine binding to the EF-hand peptides of neuronal calcium sensor-1. *Peptides.* **25**(6), 909–917.
 153. Kabbani N., Woll M.P., Nordman J.C., Levenson R. (2012) Dopamine receptor interacting proteins: targeting neuronal calcium sensor-1/D2 dopamine receptor interaction for antipsychotic drug development. *Curr. Drug Targets.* **13**(1), 72–79.
 154. Nestler E.J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**(2), 119–128.
 155. Chen X., Marrero H.G., Murphy R., Lin Y.J., Freedman J.E. (2000) Altered gating of opiate receptor-modulated K⁺ channels on amygdala neurons of morphine-dependent rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**(26), 14692–14696.
 156. Stefanski R., Ladenheim B., Lee S.H., Cadet J.L., Goldberg S.R. (1999) Neuroadaptations in the dopaminergic system after active self-administration but not after passive administration of methamphetamine. *Eur. J. Pharmacol.* **371**(2–3), 123–135.
 157. Jenney C.B., Petko J., Ebersole B., Njatcha C.V., Uzamere T.O., Alexander D.N., Grigson P.S., Levenson R. (2016) Early avoidance of a heroin-paired taste-cue and subsequent addiction-like behavior in rats. *Brain Res. Bull.* **123**, 61–70.
 158. Rodriguez Parkitna J.M., Bilecki W., Mierzejewski P., Stefanski R., Ligeza A., Bargiela A., Ziolkowska B., Kostowski W., Przewlocki R. (2004) Effects of morphine on gene expression in the rat amygdala. *J. Neurochem.* **91**(1), 38–48.
 159. Dahl J.P., Jepson C., Levenson R., Wileyto E.P., Patterson F., Berrettini W.H., Lerman C. (2006) Interaction between variation in the D2 dopamine receptor (DRD2) and the neuronal calcium sensor-1 (FREQ) genes in predicting response to nicotine replacement therapy for tobacco dependence. *Pharmacogenomics J.* **6**(3), 194–199.
 160. Multani P.K., Clarke T.K., Narasimhan S., Ambrose-Lanci L., Kampman K.M., Pettinati H.M., Oslin D.W., O’Brien C.P., Berrettini W.H., Lohoff F.W. (2012) Neuronal calcium sensor-1 and cocaine addiction: a genetic association study in African-Americans and European Americans. *Neurosci. Lett.* **531**(1), 46–51.
 161. Bahi N., Friocourt G., Carrie A., Graham M.E., Weiss J.L., Chafey P., Fauchereau F., Burgoyne R.D., Chelly J. (2003) IL1 receptor accessory protein like, a protein involved in X-linked mental retardation, interacts with Neuronal Calcium Sensor-1 and regulates exocytosis. *Hum. Mol. Genet.* **12**(12), 1415–1425.
 162. Pavlowsky A., Gianfelice A., Pallotto M., Zanchi A., Vara H., Khelifaoui M., Valnegri P., Rezai X., Bassani S., Brambilla D., Kumpost J., Blahos J., Roux M.J., Humeau Y., Chelly J., Passafaro M., Giustetto M., Billuart P., Sala C. (2010) A postsynaptic signaling pathway that may account for the cognitive defect due to IL1RAPL1 mutation. *Curr. Biol.* **20**(2), 103–115.
 163. Carrie A., Jun L., Bienvenu T., Vinet M.C., McDonnell N., Couvert P., Zemni R., Cardona A., Van Buggenhout G., Frints S., Hamel B., Moraine C., Ropers H.H., Strom T., Howell G.R., Whittaker A., Ross M.T., Kahn A., Fryns J.P., Beldjord C., Marynen P., Chelly J. (1999) A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* **23**(1), 25–31.
 164. Gambino F., Pavlowsky A., Begle A., Dupont J. L., Bahi N., Courjaret R., Gardette R., Hadjkacem H., Skala H., Poulain B., Chelly J., Vitale N., Humeau Y. (2007) IL1-receptor accessory protein-like 1 (IL1RAPL1), a protein involved in cognitive functions, regulates N-type Ca²⁺-channel and neurite

- elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**(21), 9063–9068.
165. Ng E., Georgiou J., Avila A., Trought K., Mun H.S., Hodgson M., Servinis P., Roder J.C., Collingridge G.L., Wong A.H.C. (2020) Mice lacking neuronal calcium sensor-1 show social and cognitive deficits. *Behav. Brain Res.* **381**, 112420.
 166. Piton A., Michaud J.L., Peng H., Aradhya S., Gauthier J., Mottron L., Champagne N., Lafreniere R.G., Hamdan F.F.; S2D team; Joobor R., Fombonne E., Marineau C., Cossette P., Dube M.P., Haghghi P., Drapeau P., Barker P.A., Carbonetto S., Rouleau G.A. (2008) Mutations in the calcium-related gene *ILIRAPL1* are associated with autism. *Hum. Mol. Genet.* **17**(24), 3965–3974.
 167. Handley M.T., Lian L.Y., Haynes L.P., Burgoyne R.D. (2010) Structural and functional deficits in a neuronal calcium sensor-1 mutant identified in a case of autistic spectrum disorder. *PLoS One*. **5**(5), e10534.
 168. Krey J.F., Dolmetsch R.E. (2007) Molecular mechanisms of autism: a possible role for Ca^{2+} signaling. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**(1), 112–119.
 169. Surmeier D.J., Guzman J.N., Sanchez-Padilla J., Schumacker P.T. (2011) The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience*. **198**, 221–231.
 170. Dragicevic E., Poetschke C., Duda J., Schlaudraff F., Lammel S., Schiemann J., Fauler M., Hetzel A., Watanabe M., Lujan R., Malenka R.C., Striessnig J., Liss B. (2014) Cav1.3 channels control D2-autoreceptor responses via NCS-1 in *Substantia nigra* dopamine neurons. *Brain*. **137**(Pt. 8), 2287–2302.
 171. Poetschke C., Dragicevic E., Duda J., Benkert J., Dougalis A., DeZio R., Snutch T.P., Striessnig J., Liss B. (2015) Compensatory T-type Ca^{2+} channel activity alters D2-autoreceptor responses of *Substantia nigra* dopamine neurons from Cav1.3 L-type Ca^{2+} channel KO mice. *Sci. Rep.* **5**, 13688.
 172. Borgkvist A., Mosharov E.V., Sulzer D. (2014) Calcium currents regulate dopamine autoreceptors. *Brain*. **137**(Pt. 8), 2113–2115.
 173. Simons C., Benkert J., Deuter N., Poetschke C., Pongs O., Schneider T., Duda J., Liss B. (2019) NCS-1 deficiency affects mRNA levels of genes involved in regulation of ATP synthesis and mitochondrial stress in highly vulnerable *Substantia nigra* dopaminergic neurons. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 252.
 174. Karim S., Mirza Z., Ansari S.A., Rasool M., Iqbal Z., Sohrab S.S., Kamal M.A., Abuzenadah A.M., Al-Qahatani M.H. (2014) Transcriptomics study of neurodegenerative disease: emphasis on synaptic dysfunction mechanism in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. **13**(7), 1202–1212.
 175. Canal-Martin A., Sastre J., Sanchez-Barrena M.J., Canales A., Baldominos S., Pascual N., Martinez-Gonzalez L., Molero D., Fernandez-Valle M.E., Saez E., Blanco-Gabella P., Gomez-Rubio E., Martin-Santamaria S., Saiz A., Mansilla A., Canada F.J., Jimenez-Barbero J., Martinez A., Perez-Fernandez R. (2019) Insights into real-time chemical processes in a calcium sensor protein-directed dynamic library. *Nat. Commun.* **10**(1), 2798.
 176. Romero-Pozuelo J., Dason J.S., Mansilla A., Banos-Mateos S., Sardina J.L., Chaves-Sanjuan A., Jurado-Gomez J., Santana E., Atwood H.L., Hernandez-Hernandez A., Sanchez-Barrena M.J., Ferrus A. (2014) The guanine-exchange factor Ric8a binds to the Ca^{2+} sensor NCS-1 to regulate synapse number and neurotransmitter release. *J. Cell Sci.* **127**(Pt. 19), 4246–4259.
 177. Burgoyne R.D., Helassa N., McCue H.V., Haynes L.P. (2019) Calcium sensors in neuronal function and dysfunction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **11**(5), a035154.
 178. Grabarek Z. (2006) Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J. Mol. Biol.* **359**(3), 509–525.
 179. Burgoyne R.D., Weiss J.L. (2001) The neuronal calcium sensor family of Ca^{2+} -binding proteins. *Biochem. J.* **353**(Pt. 1), 1–12.
 180. Heidarrson P.O., Bjerrum-Bohr I.J., Jensen G.A., Pongs O., Finn B.E., Poulsen F.M., Kragelund B.B. (2012) The C-terminal tail of human neuronal calcium sensor 1 regulates the conformational stability of the Ca^{2+} -activated state. *J. Mol. Biol.* **417**(1–2), 51–64.
 181. Huttner I.G., Strahl T., Osawa M., King D.S., Ames J.B., Thorner J. (2003) Molecular interactions of yeast frequenin (Frq1) with the phosphatidylinositol 4-kinase isoform, Pik1. *J. Biol. Chem.* **278**(7), 4862–4874.
 182. Lim S., Strahl T., Thorner J., Ames J.B. (2011) Structure of a Ca^{2+} -myristoyl switch protein that controls activation of a phosphatidylinositol 4-kinase in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **286**(14), 12565–12577.
 183. Stephen R., Bereta G., Golczak M., Palczewski K., Sousa M.C. (2007) Stabilizing function for myristoyl group revealed by the crystal structure of a neuronal calcium sensor, guanylate cyclase-activating protein 1. *Structure*. **15**(11), 1392–1402.
 184. Ames J.B., Ishima R., Tanaka T., Gordon J.I., Stryer L., Ikura M. (1997) Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. *Nature*. **389**(6647), 198–202.
 185. Muralidhar D., Jobby M.K., Krishnan K., Annapurna V., Chary K.V., Jeromin A., Sharma Y. (2005) Equilibrium unfolding of neuronal calcium sensor-1: N-terminal myristoylation influences unfolding and reduces protein stiffening in the presence of calcium. *J. Biol. Chem.* **280**(16), 15569–15578.
 186. Martin V.M., Johnson J.R., Haynes L.P., Barclay J.W., Burgoyne R.D. (2013) Identification of key structural elements for neuronal calcium sensor-1 function in the regulation of the temperature-dependency of locomotion in *C. elegans*. *Mol. Brain*. **6**, 39.
 187. Weiergraber O.H., Senin I.I., Zernii E.Y., Churumova V.A., Kovaleva N.A., Nazipova A.A., Permyakov S.E., Permyakov E.A., Philippov P.P., Granzin J., Koch K.W. (2006) Tuning of a neuronal calcium sensor. *J. Biol. Chem.* **281**(49), 37594–37602.

188. Zhu Y., Yang S., Qi R., Zou Y., Ma B., Nussinov R., Zhang Q. (2015) Effects of the C-terminal tail on the conformational dynamics of human neuronal calcium sensor-1 protein. *J. Phys. Chem. B.* **119**(44), 14236–14244.
189. Zhu Y., Ma B., Qi R., Nussinov R., Zhang Q. (2016) Temperature-dependent conformational properties of human neuronal calcium sensor-1 protein revealed by all-atom simulations. *J. Phys. Chem. B.* **120**(14), 3551–3559.
190. Lian L.Y., Pandalaneni S.R., Patel P., McCue H.V., Haynes L.P., Burgoyne R.D. (2011) Characterisation of the interaction of the C-terminus of the dopamine D2 receptor with neuronal calcium sensor-1. *PLoS One.* **6**(11), e27779.
191. Aravind P., Chandra K., Reddy P.P., Jeromin A., Chary K.V., Sharma Y. (2008) Regulatory and structural EF-hand motifs of neuronal calcium sensor-1: Mg²⁺ modulates Ca²⁺ binding, Ca²⁺-induced conformational changes, and equilibrium unfolding transitions. *J. Mol. Biol.* **376**(4), 1100–1115.
192. Chandra K., Ramakrishnan V., Sharma Y., Chary K.V. (2011) N-terminal myristoylation alters the calcium binding pathways in neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Inorg. Chem.* **16**(1), 81–95.
193. Jeromin A., Muralidhar D., Parameswaran M.N., Roder J., Fairwell T., Scarlata S., Dowal L., Mustafa S.M., Chary K.V., Sharma Y. (2004) N-terminal myristoylation regulates calcium-induced conformational changes in neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Chem.* **279**(26), 27158–27167.
194. Cox J.A., Durussel I., Comte M., Nef S., Nef P., Lenz S.E., Gundelfinger E.D. (1994) Cation binding and conformational changes in VILIP and NCS-1, two neuron-specific calcium-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **269**(52), 32807–32813.
195. Grubbs R.D. (2002) Intracellular magnesium and magnesium buffering. *Biomaterials.* **15**(3), 251–259.
196. O'Callaghan D.W., Burgoyne R.D. (2004) Identification of residues that determine the absence of a Ca²⁺/myristoyl switch in neuronal calcium sensor-1. *J. Biol. Chem.* **279**(14), 14347–14354.
197. O'Callaghan D.W., Hasdemir B., Leighton M., Burgoyne R.D. (2003) Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca²⁺ sensor protein KChIP1 to post-ER transport vesicles and traffic of Kv4 K⁺ channels. *J. Cell Sci.* **116**(Pt. 23), 4833–4845.
198. O'Callaghan D.W., Burgoyne R.D. (2003) Role of myristoylation in the intracellular targeting of neuronal calcium sensor (NCS) proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **31**(Pt. 5), 963–965.
199. Valentine K.G., Mesleh M.F., Opella S.J., Ikura M., Ames J.B. (2003) Structure, topology, and dynamics of myristoylated recoverin bound to phospholipid bilayers. *Biochemistry.* **42**(21), 6333–6340.
200. De Cotiis D.A., Woll M.P., Fox T.E., Hill R.B., Levenson R., Flanagan J.M. (2008) Optimized expression and purification of myristoylated human neuronal calcium sensor 1 in *E. coli*. *Protein Expr. Purif.* **61**(2), 103–112.
201. Baksheeva V.E., Nemashkalova E.L., Firsov A.M., Zalevsky A.O., Vladimirov V.I., Tikhomirova N.K., Philippov P.P., Zamyatnin A.A., Jr., Zinchenko D.V., Antonenko Y.N., Permyakov S.E., Zernii E.Y. (2020) Membrane binding of neuronal calcium sensor-1: highly specific interaction with phosphatidylinositol-3-phosphate. *Biomolecules.* **10**(2), 164.
202. Salaun C., James D.J., Chamberlain L.H. (2004) Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic.* **5**(4), 255–264.
203. Taverna E., Saba E., Linetti A., Longhi R., Jeromin A., Righi M., Clementi F., Rosa P. (2007) Localization of synaptic proteins involved in neurosecretion in different membrane microdomains. *J. Neurochem.* **100**(3), 664–677.
204. Strahl T., Huttner I.G., Lusin J.D., Osawa M., King D., Thorner J., Ames J.B. (2007) Structural insights into activation of phosphatidylinositol 4-kinase (Pik1) by yeast frequenin (Frq1). *J. Biol. Chem.* **282**(42), 30949–30959.
205. Philippov P.P., Zernii E.Y. (2018) Recoverin. In: *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Ed. Choi S. Cham: Springer Int. Publ., 4556–4563.
206. Ames J.B., Levay K., Wingard J.N., Lusin J.D., Slepak V.Z. (2006) Structural basis for calcium-induced inhibition of rhodopsin kinase by recoverin. *J. Biol. Chem.* **281**(48), 37237–37245.
207. Roca C., Martinez-Gonzalez L., Daniel-Mozo M., Sastre J., Infantes L., Mansilla A., Chaves-Sanjuan A., Gonzalez-Rubio J.M., Gil C., Canada F.J., Martinez A., Sanchez-Barrena M.J., Campillo N.E. (2018) Deciphering the inhibition of the neuronal calcium sensor 1 and the guanine exchange factor Ric8a with a small phenothiazine molecule for the rational generation of therapeutic synapse function regulators. *J. Med. Chem.* **61**(14), 5910–5921.
208. Mansilla A., Chaves-Sanjuan A., Campillo N.E., Semelidou O., Martinez-Gonzalez L., Infantes L., Gonzalez-Rubio J.M., Gil C., Conde S., Skoulakis E.M., Ferrus A., Martinez A., Sanchez-Barrena M.J. (2017) Interference of the complex between NCS-1 and Ric8a with phenothiazines regulates synaptic function and is an approach for fragile X syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**(6), E999–E1008.
209. Nguyen L.D., Petri E.T., Huynh L.K., Ehrlich B.E. (2019) Characterization of NCS1-InsP3R1 interaction and its functional significance. *J. Biol. Chem.* **294**(49), 18923–18933.
210. Bellucci L., Corni S., Di Felice R., Paci E. (2013) The structure of neuronal calcium sensor-1 in solution revealed by molecular dynamics simulations. *PLoS One.* **8**(9), e74383.
211. Zhu Y., Wu Y., Luo Y., Zou Y., Ma B., Zhang Q. (2014) R102Q mutation shifts the salt-bridge network and reduces the structural flexibility of human neuronal calcium sensor-1 protein. *J. Phys. Chem. B.* **118**(46), 13112–13122.

212. Brumback A.C., Ellwood I.T., Kjaerby C., Iafrati J., Robinson S., Lee A.T., Patel T., Nagaraj S., Davatolhagh F., Sohal V.S. (2018) Identifying specific prefrontal neurons that contribute to autism-associated abnormalities in physiology and social behavior. *Mol. Psychiatry*. **23**(100), 2078–2089.
213. Tsvetkov P.O., Roman A.Y., Baksheeva V.E., Nazipova A.A., Shevelyova M.P., Vladimirov V.I., Buyanova M.F., Zinchenko D.V., Zamyatnin A.A., Jr., Devred F., Golovin A.V., Permyakov S.E., Zernii E.Y. (2018) Functional status of neuronal calcium sensor-1 is modulated by zinc binding. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 459.
214. Baksheeva V.E., Tsvetkov P.O., Zalevsky A.O., Vladimirov V.I., Gorokhovets N.V., Zinchenko D.V., Permyakov S.E., Devred F., Zernii E.Y. (2022) Zinc modulation of neuronal calcium sensor proteins: three modes of interaction with different structural outcomes. *Biomolecules*. **12** (7), 956.
215. Maret W. (2011) Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins. *Biomaterials*. **24**(3), 411–418.
216. Ugarte M., Osborne N.N. (2014) Recent advances in the understanding of the role of zinc in ocular tissues. *Metallomics*. **6**(2), 189–200.
217. Watt N.T., Whitehouse I.J., Hooper N.M. (2010) The role of zinc in Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* **2011**, 971021.
218. Li Y., Anderegg L., Yuki K., Omura K., Yin Y., Gilbert H.Y., Erdogan B., Asdourian M.S., Shrock C., de Lima S., Apfel U.P., Zhuo Y., Hershinkel M., Lipard S.J., Rosenberg P.A., Benowitz L. (2017) Mobile zinc increases rapidly in the retina after optic nerve injury and regulates ganglion cell survival and optic nerve regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**(2), E209–E218.
219. Bossy-Wetzel E., Talantova M.V., Lee W.D., Scholze M.N., Harrop A., Mathews E., Gotz T., Han J., Ellisman M.H., Perkins G.A., Lipton S.A. (2004) Crosstalk between nitric oxide and zinc pathways to neuronal cell death involving mitochondrial dysfunction and p38-activated K⁺ channels. *Neuron*. **41**(3), 351–365.
220. Zernii E.Y., Nazipova A.A., Gancharova O.S., Kazakov A.S., Serebryakova M.V., Zinchenko D.V., Tikhomirova N.K., Senin I.I., Philippov P.P., Permyakov E.A., Permyakov S.E. (2015) Light-induced disulfide dimerization of recoverin under *ex vivo* and *in vivo* conditions. *Free Radic. Biol. Med.* **83**, 283–295.
221. Liebl M.P., Kaya A.M., Tenzer S., Mittenzwei R., Koziollek-Drechsler I., Schild H., Moosmann B., Behl C., Clement A.M. (2014) Dimerization of vision-like protein 1 is regulated by oxidative stress and calcium and is a pathological hallmark of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* **72**, 41–54.
222. Permyakov S.E., Nazipova A.A., Denesyuk A.I., Bakunts A.G., Zinchenko D.V., Lipkin V.M., Uversky V.N., Permyakov E.A. (2007) Recoverin as a redox-sensitive protein. *J. Proteome Res.* **6**(5), 1855–1863.
223. Permyakov S.E., Zernii E.Y., Knyazeva E.L., Denesyuk A.I., Nazipova A.A., Kolpakova T.V., Zinchenko D.V., Philippov P.P., Permyakov E.A., Senin I.I. (2012) Oxidation mimicking substitution of conservative cysteine in recoverin suppresses its membrane association. *Amino Acids*. **42**(4), 1435–1442.
224. Zernii E.Y., Nazipova A.A., Nemashkalova E.L., Kazakov A.S., Gancharova O.S., Serebryakova M.V., Tikhomirova N.K., Baksheeva V.E., Vladimirov V.I., Zinchenko D.V., Philippov P.P., Senin I.I., Permyakov S.E. (2018) Light-induced thiol oxidation of recoverin affects rhodopsin desensitization. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 474.
225. Beatty S., Koh H., Phil M., Henson D., Boulton M. (2000) The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* **45**(2), 115–134.
226. Baksheeva V.E., Tiulina V.V., Tikhomirova N.K., Gancharova O.S., Komarov S.V., Philippov P.P., Zamyatnin A.A., Jr., Senin I.I., Zernii E.Y. (2018) Suppression of light-induced oxidative stress in the retina by mitochondria-targeted antioxidant. *Antioxidants* (Basel). **8**(1), 3.
227. Chistyakov D.V., Baksheeva V.E., Tiulina V.V., Gorainov S.V., Azbukina N.V., Gancharova O.S., Arifulin E.A., Komarov S.V., Chistyakov V.V., Tikhomirova N.K., Zamyatnin A.A., Philippov P.P., Senin I.I., Sergeeva M.G., Zernii E.Y. (2020) Mechanisms and treatment of light-induced retinal degeneration-associated inflammation: insights from biochemical profiling of the aqueous humor. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(3), 704.
228. Baksheeva V.E., Baldin A.V., Zalevsky A.O., Nazipova A.A., Kazakov A.S., Vladimirov V.I., Gorokhovets N.V., Devred F., Philippov P.P., Bazhin A.V., Golovin A.V., Zamyatnin A.A., Jr., Zinchenko D.V., Tsvetkov P.O., Permyakov S.E., Zernii E.Y. (2021) Disulfide dimerization of neuronal calcium sensor-1: implications for zinc and redox signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(22), 12602.
229. Holtz W.A., Turetzky J.M., Jong Y.J., O'Malley K.L. (2006) Oxidative stress-triggered unfolded protein response is upstream of intrinsic cell death evoked by parkinsonian mimetics. *J. Neurochem.* **99**(1), 54–69.
230. Oshikawa M., Tsutsui C., Ikegami T., Fuchida Y., Matsubara M., Toyama S., Usami R., Ohtoko K., Kato S. (2011) Full-length transcriptome analysis of human retina-derived cell lines ARPE-19 and Y79 using the vector-capping method. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**(9), 6662–6670.
231. Burgoyne R.D., Haynes L.P. (2012) Understanding the physiological roles of the neuronal calcium sensor proteins. *Mol. Brain*. **5**(1), 2.

Neuronal Calcium Sensor 1: a Zinc/Redox-Dependent Protein of Nervous System Signaling Pathways

V. E. Baksheeva¹, A. A. Zamyatnin, Jr.^{1, 2, 3, 4}, and E. Yu. Zernii^{1, *}

¹*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

²*Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia*

³*Scientific Center for Translation Medicine, Sirius University of Science and Technology, Sochi, 354340 Russia*

⁴*Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: zerni@belozersky.msu.ru

Intracellular calcium signals play a key role in the regulation of nervous system structure and function. The control of neuronal excitability and plasticity by calcium ions underlies the mechanisms of higher nervous activity, and the mechanisms of this control are of particular interest to researchers. In recent decades, a family of highly specialized neuronal proteins that can translate the information contained in calcium signals into the regulation of channels, enzymes, receptors, and transcription factors has been described. The most abundant member of this family is neuronal calcium sensor-1 (NCS-1), which is intensively expressed in CNS neurons and controls such vital processes as neuronal growth and survival, reception, neurotransmission and synaptic plasticity. In addition to calcium ions, NCS-1 may bind intracellular 'mobile' zinc, increased concentration of which is a characteristic feature of cells under oxidative stress. Zinc coordination under these conditions stimulates NCS-1 oxidation to form a disulfide dimer (dNCS-1) with altered functional properties. The combined effect of mobile zinc and the increased redox potential of the medium can thus induce the aberrant NCS-1 activity involving signals for survival of neuronal cells or induction of their apoptosis and, as a consequence, the development of neurodegenerative processes. The review details the localization, regulation of expression, structure and molecular properties of NCS-1, as well as current data on its signaling activity in health and disease, including zinc-dependent redox-regulation cascades.

Keywords: neurons, calcium signals, neuronal calcium sensors, neuronal calcium sensor-1, zinc, oxidative stress, redox regulation, neurodegenerative diseases