



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek
Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija Smjer: Biokemija

Lucija Marčelić

Signalni putevi kalcijevog iona

Mechanism of Ca^{2+} disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating

King-Ho Cheung, Diana Shineman, Marioly Müller, César Cárdenas, Lijuan Mei, Jun Yang, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo, Virginia M-Y Lee, J Kevin Foskett

Kemijski seminar I

Zagreb, 2025 godina

Sadržaj

1	UVOD	3
2	OSNOVNI PRINCIPI SIGNALIZACIJE KALCIJEM	4
3	KLJUČNI RECEPTORI U KALCIJEVOJ SIGNALIZACIJI.....	6
3.1	Inozitol-1,4,5-trifosfatni receptor.....	6
3.2	Rijanodinski receptor.....	7
4	MEHANIZAM DISRUPCIJE Ca^{2+} U ALZHEIMEROVOJ BOLESTI REGULACIJOM PRESENELINA U OTVARANJU KANALA IP_3R.....	7
4.1	Signaliziranje kalcijem i neurodegenerativne bolesti.....	7
4.2	Patogeneza Alzheimerove bolesti	8
4.3	Materijali i metode	9
4.4	Rezultati i diskusija	9
5	ZAKLJUČAK.....	14
6	LITERATURNI IZVORI.....	XV

1 Uvod

Kalcij je svestrana signalna molekula koja omogućuje širok raspon fizioloških procesa u stanici, međutim njegova neravnoteža može značajno utjecati na staničnu aktivnost. Kalcijevi ioni (Ca^{2+}) imaju ključnu ulogu u staničnoj signalizaciji i održavanju homeostaze. Kako signali potaknuti kalcijem djeluju u zdravlju, bolesti i starenju? Razumijevanje tog sustava nam otvara mogućnosti za razvoj terapijskih strategija s ciljem obnavljanja normalnog funkcioniranja stanice. Kalcij se često promatra kao signal u kontekstu njegova povišenja, no i odsutnost povećanja može imati signalnu ulogu (1). Sve je više radova koji povezuju disregulaciju unutarstanične razine kalcija s patogeneom raznih neurodegenerativnih bolesti, poput Alzheimerove bolesti (bolest koja je obilježena progresivnim gubitkom pamćenja, poremećajem mišljenja te promjenama u ponašanju). Nažalost patofiziologija Alzheimerove bolesti još uvijek nije razjašnjena iako je bolest prvi put opisana prije više od 100 godina. Danas je dostupan ograničen broj lijekova za ublažavanje simptoma kao što su antagonisti N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora i inhibitori acetilkolinesteraze (AChE), ali s neželjenim nuspojavama. Osim toga, i druge terapijske strategije, poput imunoterapije i inhibicije β -sekretaze, pokazale su značajna ograničenja (2). Brojna istraživanja sugeriraju da terapijski pristupi usmjereni na Ca^{2+} -povezane receptore mogu povoljno utjecati na patološke promjene u Alzheimerovoj bolesti, uključujući neuroprotekciju, poboljšanje sinaptičkih funkcija te smanjenje nakupljanja amiloidnih i tau agregata, te rezultirali razvojem novih lijekova boljeg terapijskog učinka i s minimalnim nuspojavama (2).

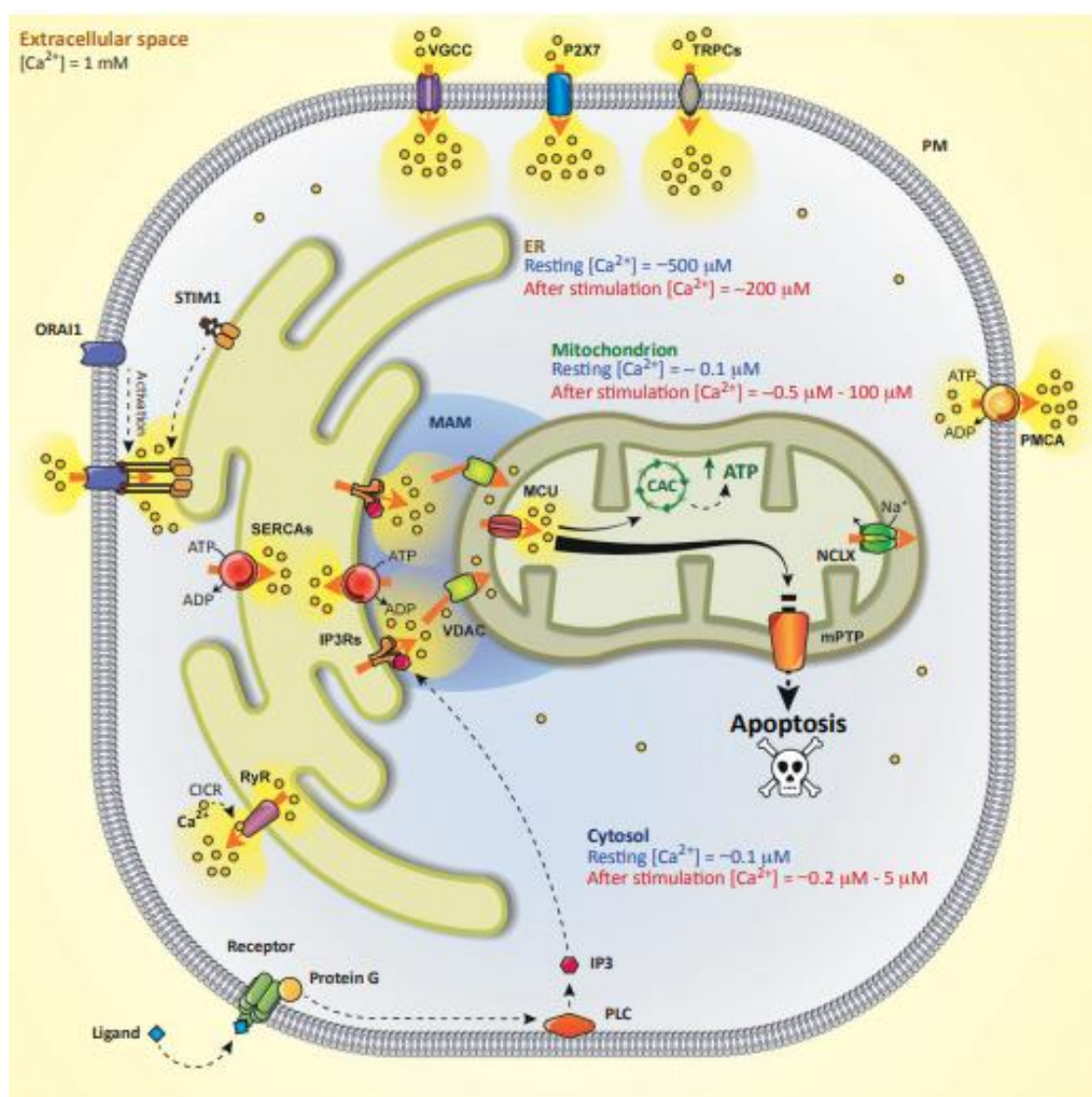
2 Osnovni principi signalizacije kalcijem

Osnovni kemijski princip signalizacije osniva se na difuziji to jest prijenosu kalcijevih iona (Ca^{2+}), ako je došlo do promjene u koncentraciji između različitih staničnih odjeljaka. U izvanstaničnom prostoru i endoplazmatskom retikulumu, koncentracija Ca^{2+} je visoka, u citosolu i mitohondrijima je niska koncentracija Ca^{2+} . Ioni i molekule kreću se niz koncentracijski gradijent, a obzirom na to da je kalcij nabijeni ion, za prolazak kroz staničnu membranu potrebni su specifični ionski kanali (Slika 1); naponom regulirani kalcijevi kanali, P2X7 receptorski kanali i TRP (*engl. transient receptor potential*). Osim što Ca^{2+} ulaze u stanicu, mogu se oslobađati i iz unutarstaničnih skladišta putem specifičnih kanala smještenih na membranama staničnih organela. Ključni kanali su inozitol 1,4,5-trifosfatni receptori (IP_3R), rijanodinski receptori (RyR) i TRP kanali. Endoplazmatski retikulum (ER) i sarkoplazmatski retikulum (SR) predstavljaju glavna skladišta Ca^{2+} u neuronima i mišićnim stanicama, no i drugi organeli, poput Golgijevog aparata, jezgrine ovojnice i lizosoma mogu sudjelovati u Ca^{2+} -signaliziranju pod određenim uvjetima. Iako i mitohondriji i peroksisomi mogu pohraniti kalcij, oni nisu primarni izvori stanične Ca^{2+} -signalizacije (1). Ključan je proces prijenosa kalcijevih iona unutar stanice jer se vežu za razne enzime, aktiviraju signalne puteve i regulira brojne stanične procese (3).

Temeljni princip signaliziranja kalcijem obuhvaća promjenu unutarstanične koncentracije Ca^{2+} , koji onda pokreće različite stanične odgovore. Hormonski signali, neurotransmiteri, faktori rasta, protutijela, mehanički podražaji, temperature promjene te mikrobi su ekstrinzični faktori koji mogu stimulirati povišenje koncentracije citosolnog kalcija. Također, kalcijevi signali mogu nastati intrinzično, poput spontanih signala u srčanim miocitima (1). Promjene u koncentraciji Ca^{2+} mogu se mjeriti pomoću fluorescentne boje Fura-2 i obično dosežu razinu između 0.5 i 1 μM . Povišenja iznad 1 μM nisu fiziološki stabilna te ukazuju na nekakvo stanično oštećenje zbog moguće aktivacije Ca^{2+} -ovisnih proteaza (1). Stvaraju se reaktivni kisikovi spojevi te dolazi do disfunkcije organela kao što je mitohondrijska permeabilnost. Takvi procesi mogu rezultirati smrću vaskularnih glatkih mišićnih stanica i neurona izloženih kalcificiranim česticama. Kalcij je povezan s brojnim patološkim stanjima, čak i manje promjene u Ca^{2+} signaliziranju mogu uzrokovati značajne funkcionalne i fenotipske promjene (1). Neki procesi unutar stanice inhibiraju se povišenjem citosolnog Ca^{2+} , primjerice, transkripcijski represor DREAM (*engl. downstream regulatory element antagonist modulator*) veže se za ciljne gene i sprječava njihovu transkripciju pri niskim razinama kalcija (1).

Signalni put Ca^{2+} unutar stanice počinje kao odgovor na vanjski podražaj primarnim glasnicima, izvanstaničnim molekulama, koji se vežu za G-protein-spregnuti receptor (GPCR *engl. G protein coupled-receptor*). Aktivira se fosfolipaza C (PLC), enzim koji cijepa molekulu PIP_2 na inozitol 1,4,5-trifosfat (IP_3). Ligand IP_3 veže se na IP_3R , koji se nalazi na endoplazmatskom retikulumu, potičući oslobađanje Ca^{2+} u citosol. Mitohondrij koji je posebno osjetljiv na bilo kakvu promjenu u koncentraciji Ca^{2+} te preuzima velike količine iona preko posebnog kontaktnog mjesta s endoplazmatskim retikulumom, poznatog kao MAM (*engl. mitochondria-associated membranes*). Oslobađanje Ca^{2+} iz ER-a prema mitohondriju potiče stanični metabolizam i sintezu ATP-a jer Ca^{2+} postaje kofaktor za enzime trikarboksilnog ciklusa (3).

Ca^{2+} ATP-aza (PMCA, engl. *plasma membrane Ca^{2+} ATPase*) i $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmjenjivač (NCX), uklanjaju kalcijeve ione iz citosola i vraćaju koncentraciju Ca^{2+} na bazalnu razinu, koja iznosi približno 100 nM (Slika 1). Unutarstanična skladišta, poput ER ponovno se puni Ca^{2+} s pomoću sarko-endoplazmatske Ca^{2+} ATP-aze (SERCA, engl. *sarcoplasmic/endoplasmic Ca^{2+} ATPase*). STIM1 i ORAI1 su proteini koji reguliraju mehanizam skladištem-induciranog unosa kalcija (SOCE, engl. *store-operated calcium entry*), ključan za održavanje stanične homeostaze kalcija (3).



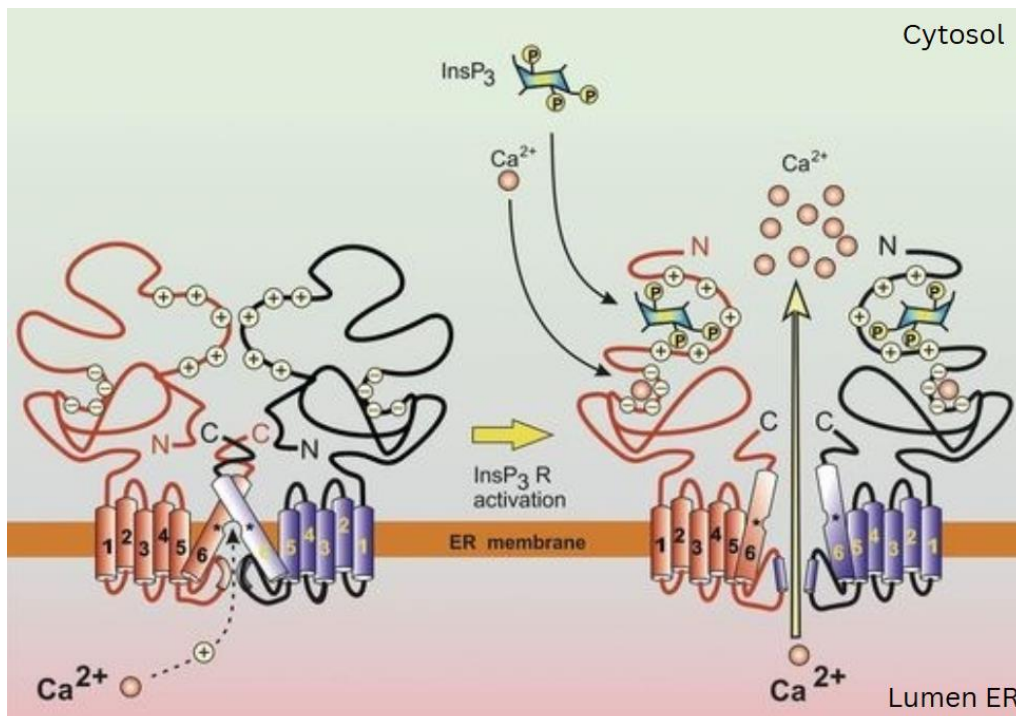
Slika 1: Mehanizam Ca^{2+} signaliziranja u stanici, reguliran pomoću kanala, pumpi, transportera i veznih proteina. Ca^{2+} ioni su prikazani žutim kuglicama. VGCC (engl. *Voltage-gated calcium channels*), P2X7 i TRPCs su ionski kanali na plazmatskoj membrani stanice koji propuštaju Ca^{2+} u unutrašnjost stanice. Na dnu slike je prikazan GPCR koji vezanjem liganda, aktivira PLC te nastane IP₃. Prikazan je endoplazmatski retikulum sa receptorima RyR i IP₃R, te mitohondrij sa odgovarajućim receptorima i pumpama. Označene su koncentracije Ca^{2+} u citosolu, mitohondriju, endoplazmatskom retikulumu i izvanstaničnom prostoru (3).

3 Ključni receptori u kalcijevoj signalizaciji

Oslobađanje Ca^{2+} iz unutarnjih skladišta kontroliraju različiti kanali, među kojima su obitelji inozitol-1,4,5-trifosfatnog receptora (IP_3R) i rijanodinskog receptora (RyR) (4).

3.1 Inozitol-1,4,5-trifosfatni receptor

IP_3R su kanali koji oslobađaju Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma kao odgovor na razni niz vanjskih podražaja od hormona, faktora rasta do neurotransmitera. Mnogi fundamentalni biološki procesi, poput sekrecije, kontrakcije glatkih mišića, transkripcije gena i oplodnje, su aktivirani ili regulirani pomoću funkcionalnih IP_3R -a (5). Ovaj receptor je homotetramerni kanal, koji sadrži 4 vezna mjesta, a usidren je u endoplazmatskom retikulumu i jezgrinoj ovojnici (Slika 2). Barem jedan od tri izoformi IP_3R ($\text{IP}_3\text{R}1$, $\text{IP}_3\text{R}2$, $\text{IP}_3\text{R}3$) eksprimira se u svakoj stanici našeg tijela, a nastaju kao produkti triju različitih gena i alternativnim prekrajanjem mRNA (6). Razlikuju se po fiziološkim svojstvima, ali imaju sličnu primarnu strukturu. Stanice koriste ta različita svojstva kako bi generirali Ca^{2+} signale s različitim prostornim i vremenskim karakteristikama da bi kontrolirali različite stanične funkcije. Kao što je već ranije spomenuto, ovaj receptor je ugrađen u endoplazmatskom retikulumu sa 6 transmembranskih domena, sa petljom koja povezuje podjedinicu 5 i podjedinicu 6. Dio petlje koji se produljuje u lumenu endoplazmatskog retikuluma je glikoziliran. Domena, na kojoj se nalazi vezno mjesto za IP_3 , je lociran na samom kraju dugog NH_2 -kraja koji strši u citoplazmi te je vezan na podjedinicu 1. Konformacijska promjena inducirana vezanjem IP_3 i Ca^{2+} , prenosi se do transmembranskog dijela kako bi se otvorio kanal. Mnogo je regulatora ovog receptora koji djeluju na tu modulatornu domenu da bi se kontroliralo oslobađanje Ca^{2+} (7).



Slika 2: Struktura i promjena konformacije IP_3R (7). Lijevo je zatvoreni konformacijski oblik IP_3R , a desno je otvoreni konformacijski oblik kroz koji Ca^{2+} prolaze iz lumena ER-a u citosol stanice.

Ca^{2+} u lumenu endoplazmatskog retikuluma čini receptor osjetljivim na IP_3 , a na citoplazmatskoj površini, niske koncentracije Ca^{2+} senzibilizira receptor dok ga visoke koncentracije inhibiraju (6). Sam proces je poznat kao Ca^{2+} inducirano oslobađanje Ca^{2+} (CICR, *engl. Calcium-Induced Calcium Release*) gdje sami Ca^{2+} potiču oslobađanje svojih iona iz unutarstaničnih skladišta (4). CICR je sredstvo za pojačavanje mikroskopskih početnih događaja kako bi se generirali kalcijevi signali. Ovaj proces je vrlo važan jer da bi kalcij kontrolirao staničnu aktivnost, mora doseći mete koje su udaljene od mjesta inicijacije signala, a pomoću CICR-a stanice se ne moraju isključivo osloniti na sporu difuziju kalcijevih iona. Disregulacija IP_3R -a se isprepliće s patofiziologijom raznih bolesti poput Huntingtonove bolesti, amiotrofične lateralne skleroze, autizma, raka i Alzheimerove bolesti (8). Upravo zbog važnosti ovih receptora, potrebno je pronaći membransko propusne IP_3R inhibitore jer jedini poznati antagonisti su heparin, kofein i alkaloid izorliran iz spužve *Xestospongia sp.* (*engl. Xestospongin C*), koji nažalost nisu specifično selektivni inhibitori IP_3R (9).

3.2 Rijanodinski receptor

Drugi tip receptora koji propušta Ca^{2+} je rijanodinski receptor. Nazvan je po insekticidu, izoliranog iz biljke *Ryania speciosa* (10). Također se radi o homotetrameru te rijanodinski receptori dijele značajnu strukturnu homologiju sa IP_3R . U skeletnim mišićima, otvaranje rijanodinskog receptora je potpomognut direktnom konformacijskom interakcijom sa dihidropiridinskim recptorom u t-tubulu membrane. Ovaj receptor također se nalazi u srčanom tkivu i neuronima. Sparivanje IP_3R -a i RyR -a omogućuje brzo oslobađanje Ca^{2+} kada akcijski potencijal ulazi u t-tubularni sustav. Međutim fiziološki ligand za rijanodinski receptor je najčešće sam Ca^{2+} pa i rijanodinski receptor spada pod CICR-tipovima receptora. Iako se smatra da rijanodinski receptor je primarno reguliran CICR-om, određene male molekule se ponašaju kao regulatorni ligandi, poput cikličkog adenozin difosfat riboze, te povećavaju vjerojatnost otvaranja rijanodinskog receptora na način da povećavaju osjetljivost na Ca^{2+} (6). Jedno istraživanje (11) je pokazalo da terapije temeljene na kanabinoidima mogu modulirati RyR te u konačnici preokrenuti patološke promjene povezane s Alzheimerovom bolešću ublažujući kognitivne deficite (2).

4 Mehanizam disrupcije Ca^{2+} u Alzheimerovoj bolesti regulacijom presenelina u otvaranju kanala IP_3R

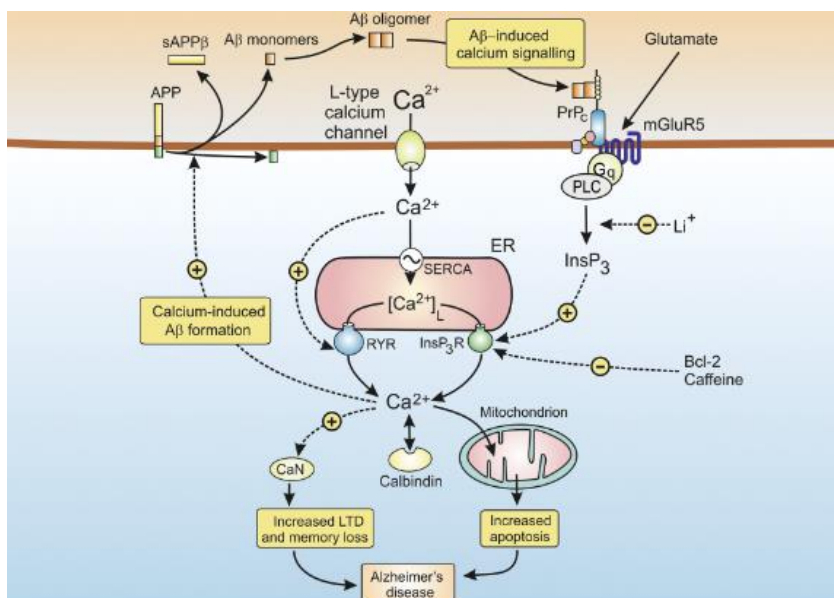
4.1 Signaliziranje kalcijem i neurodegenerativne bolesti

Kalcij je ključan u regulaciji neuronske podražljivosti koja se može postići direktno, induciranjem aktivnosti ionskog kanala ili indirektno, aktivacijom signalnih puteva. Kalcijevi ioni uključeni su u mnogim aspektima neuralne fiziologije od aktivnosti, rasta i diferencijacije neurona do sinaptičke plastičnosti, učenja, pamćenja, patofiziologije, nekroze, apoptoze i degeneracije (12). Također važan je faktor u neuronskoj hiperaktivnosti, generiranju napadaja i epileptogenezi (13). Mutacije u kalcijevim kanalima su detektirane kod genetskih epilepsija, međutim detektirane su i kod epilepsije nastaloj kao posljedica traume mozga, moždanog udara, infekcije ili tumora. Takva oštećenja uzrokuju nakupljanje kalcija što onda može povećati osjetljivost neuronskih mreža i potaknuti staničnu smrt (12). Smatra se da je jako složena uloga kalcijevog signalnog puta uključenog u epilepsiji ali da je to ključ za razvoj

novih antiepileptičnih lijekova. Moždana ishemija, koja nastaje zbog smanjenog dotoka krvi i kisika, remeti oksidativnu fosforilaciju, bioenergetiku stanice i sintezu ATP (12). U fiziološkim uvjetima, unos kalcija unutar mitohondrija može stimulirati sintezu mitohondrijskog ATP-a kako bi se zadovoljile energetske potrebe stanice (14).

4.2 Patogeneza Alzheimerove bolesti

Alzheimerova bolest kao najčešći uzročnik demencije, uključuje postupan razvoj neurodegeneracije, koja u konačnici završava fatalno. Ova bolest se najčešće javlja kod osoba starijih od 60 godina, no oko 10 % oboljelih nasljeđuje ju kao autosomno dominantnu osobinu zbog čega se može razviti i već u 30. godini (2). U raznim istraživanjima pokazalo se da mutacije na amiloidnom prekursor proteinu (APP) i presenelinu (PS1) uzrokuju nasljednu Alzheimerovu bolest (FAD, *engl. Familial Alzheimer disease*). Glavna obilježja Alzheimerove bolesti su akumulacija izvanstaničnih β -amiloidnih plakova i stvaranje unutarstaničnih neurofibrilarnih čvorova. Prema "amiloidnoj hipotezi" (15), nakupljanje oligomernih oblika $A\beta$ (amiloid β protein) smatra se uzrokom Alzheimerovu bolest. Međutim, novi dokazi upućuju na to da i disrupcija međustaničnog Ca^{2+} signaliziranja igra ključnu ulogu u patogenezi Alzheimerove bolesti. Prije identifikacije presenelina, otkriveno je da fibroblasti izolirani od pacijenata oboljelih od Alzheimerove bolesti, proizvode pretjerano povećane intracelularne količine Ca^{2+} . Do te pojave dolazi zbog aktivacije GPCR-a (Slika 3) na kojeg se vežu bradikinin, $5HT_2A$ i glutamat što stimulira fosfolipazu C. Potom ovaj enzim katalizira sintezu IP_3 koji se veže za IP_3R , rezultirajući oslobađanjem Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma što posljedično povećava intracelularne koncentracije Ca^{2+} (12). Presenilini (PS1 i PS2) ključni su u kompleksu γ -sekretaze intramembranske proteaze koja cijepa amiloid prekursor protein (APP) kako bi nastao topljivi $A\beta$ koji se u konačnici nakuplja u mozgu. Mutacije u presenilinima rezultiraju disregulacijom signaliziranja Ca^{2+} koja je zaslužna za FAD. Možda i najbitnije otkriće iz glavnog rada je upravo to što su uočili korelaciju između PS mutacija i pojačanog otvaranja IP_3R . Naime, dolazi do pretjeranog oslobađanja Ca^{2+} koja potiče LTD (*engl. long-term depression*): gubitak glutamatnih receptora i dendritičkih protruzija što uzrokuje gubitak pamćenja (7).



Slika 3: Uloga IP_3/Ca^{2+} signalnog puta u patofiziologiji Alzheimerove bolesti (7).

Brojna istraživanja upućuju na to da terapije usmjerene na receptore povezane s kalcijem mogu preokrenuti patološke promjene povezane s Alzheimerovom bolešću, na način da se zaštite neuroni, ublažuje sinaptička oštećenja te smanji agregacija amiloida i tau proteina (2). Na primjer, mitohondrijska permeabilna tranzicijska pora (mPTP) ima ključnu ulogu u održavanju homeostaze kalcija u mitohondrijima, a razna istraživanja su pokazala da inhibicija mPTP-a može ublažiti kognitivne poremećaje kod transgeničnih miševa s Alzheimerovom bolešću (16). Zbog sve većeg broja istraživanja i dokaza, smatra se da je razvoj lijekova za Alzheimerovu bolest, temeljenih na regulaciji homeostaze Ca^{2+} , izvediv i obećavajući pristup.

4.3 Materijali i metode

Za ovo istraživanje, uzgajali su stanice kukca *Spodoptera frugiperda* (Sf9) te ljudske PS baculovirusne konstrukte (PS1-WT, PS1-M146L, PS2-WT i PS2-N141I), generirani koristeći *Bac-to-Bac* sustav. Onda je ekspresija potvrđena Westernskom metodom otiska (Slika 5) koristeći anti-PS1 i anti-PS2 antitijela, a lokalizacija PS u Sf9 stanicama potvrđena je imunohistokemijom. Također su uzgajali kokoške DT40 stanice, gdje su ljudski PS1-WT i mutirani M146L cDNA subklonirali u pIRES2-EGFP te unijeli u stanice elektroporacijom. Kako bi odabrali stabilne poliklonalne linije, transficirane stanice uzgajane su 2 tjedna uz 2 mg/ml u odgovarajućem mediju. Ekspresija PS ponovno je potvrđena Westernskom metodom otiska. Mutirani ljudski APP (amiloidni prekursorski protein) uveden je u PS1-ekspimirane DT40 stanice putem retrovirusne infekcije, te je ekspresija potvrđena poliklonskim anti-APP antitijelom (12). Također su koristili kortikalne neurone iz mišjih embrija.

Izolirane su jezgre iz Sf9 i DT40 stanica, za patch-clamp eksperimente gdje su analizu proveli u standardnoj otopini koja je sadržavala 140 mM KCl, 10 mM HEPES i 0,5 mM BAPTA (slobodni $[\text{Ca}^{2+}] = 300 \text{ nM}$, pH 7,3). A otopina u pipeti se sastojala od 140 mM KCl, 0,5 mM ATP, 10 mM HEPES i 1 mM slobodnog Ca^{2+} (pH 7,3) (12).

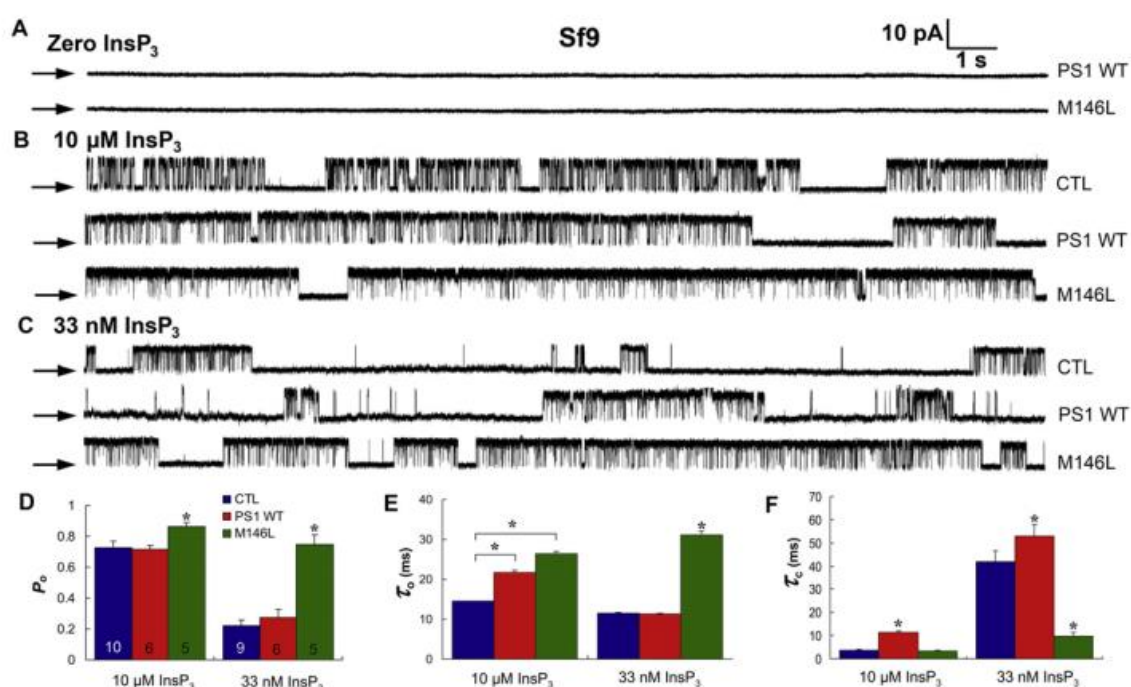
Razinu Ca^{2+} u stanicama mjerili su Fura-2AM analizom, gdje su tretirali DT40 stanice Fura-2 bojom. Razina Ca^{2+} ispuštenog iz endoplazmatskog retikuluma mjerio se kao odgovor na tapsigargin (nekompetitivni inhibitor SERCA), ionofor jonomicin (koji veže izvanstanični Ca^{2+}) ili niskoafinitetni indikator Mag-Fura-2. Promjene u koncentraciji Ca^{2+} u endoplazmatskom retikulumu prikazane su kao omjer (R/R_0). Pri čemu je R_0 referenca za ispljene zalihe Ca^{2+} pomoću 1 mM jonomicina. Brzina ispuštanja Ca^{2+} izražena je kao $\Delta(R/R_0) \text{ s}^{-1}$ (12).

4.4 Rezultati i diskusija

U ovom radu ispitan je utjecaj ekspresije PS na aktivnost IP_3R na nativnim membranama endoplazmatskog retikuluma izoliranih Sf9 stanica pomoću *patch-clamp* tehnike. Stanice kukca *Spodoptera frugiperda* izražavaju izoformu IP_3R -a, sličan tipu 1 kod sisavaca koji dominira u mozgu i ima slične propusne i regulacijske osobine. U kontrolama (Slika 4), IP_3R su bili aktivni u prisutnosti 10 μM IP_3 i 1 μM Ca^{2+} , s visokom vjerojatnošću otvaranja ($P_0 = 0,76 \pm 0,05$). $P_0 = 0,76$ znači da je 76 % vremena tijekom snimanja, kanal bio otvoren. Ljudski PS1-WT i FAD mutirani PS1-M146L izraženi su u Sf9 stanicama kao cjeloviti proteini u endoplazmatskom retikulumu i jezgrinoj ovojnici. U jezgrama PS1-M146L ili PS1-WT stanica, nisu otkriveni novi ionski kanali, niti je zabilježena aktivnost u odsutnosti IP_3 ili u prisustvu IP_3 i kompetitivnog inhibitora heparina. U stanicama PS1-WT, vjerojatnost

otvaranja (P_o) IP_3R -a pri koncentraciji IP_3 od $10 \mu M$, bila je slična kontroli, što znači da PS1-WT ne utječe značajno na aktivnost kanala (Slika 4: B i D). U stanicama PS1-M146L, P_o je bio značajno povećan ($0,86 \pm 0,03$; $p < 0,05$) te su kanali bili otvoreni duže vrijeme, za razliku od kontrolnih stanica (12).

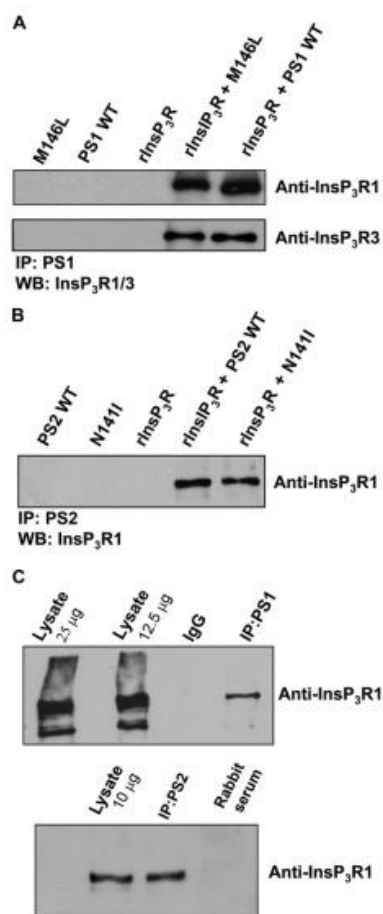
Najbitniji zaključak iz slike 4 je da mutacija PS-a ne samo da povećava P_o , već i produljuje trajanje otvorenog stanja kanala, pojačavajući time ukupno signaliziranje kalcijem. Pri smanjenju IP_3 na 33 nM , P_o u kontrolnim stanicama pao je na $0,27 \pm 0,01$, što potvrđuje da je aktivnost kanala ovisna o koncentraciji IP_3 . U stanicama s PS1-M146L, P_o je ostao visok ($0,75 \pm 0,06$). Pretpostavka je da zatvoreni konformacijski oblik IP_3R -a u mutiranim stanicama se destabilizira pa da je posljedica produljenje otvorene konformacije kanala. Iz grafa F, vidljivo je da PS1-WT nije značajno utjecao na P_o , ali je blago produljio zatvoreno stanje kanala.



Slika 4: (A–C) Zapisi struje u izoliranim jezgrama Sf9 stanica inficiranih s PS1-WT ili M146L baculovirusima; (A) u odsutnosti ili (B) prisutnosti zasićujuće ($10 \mu M$) ili (C) nezasićujuće (33 nM) koncentracije IP_3 . (A) Aktivnost kanala nije potaknuta samim PS1 u odsutnosti IP_3 (B i C) IP_3R kanali su aktivirani u prisutnosti IP_3 . Grafovi prikazuju učinke ekspresije PS1: (D) na vjerojatnost otvorenog stanja IP_3R (P_o), (E) na prosječno vrijeme otvorenog stanja (t_o) i (F) prosječno vrijeme zatvorenog stanja (t_c). Stupci prikazuju standardnu pogrešku srednje vrijednosti, a zvjezdice označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,01$) (12).

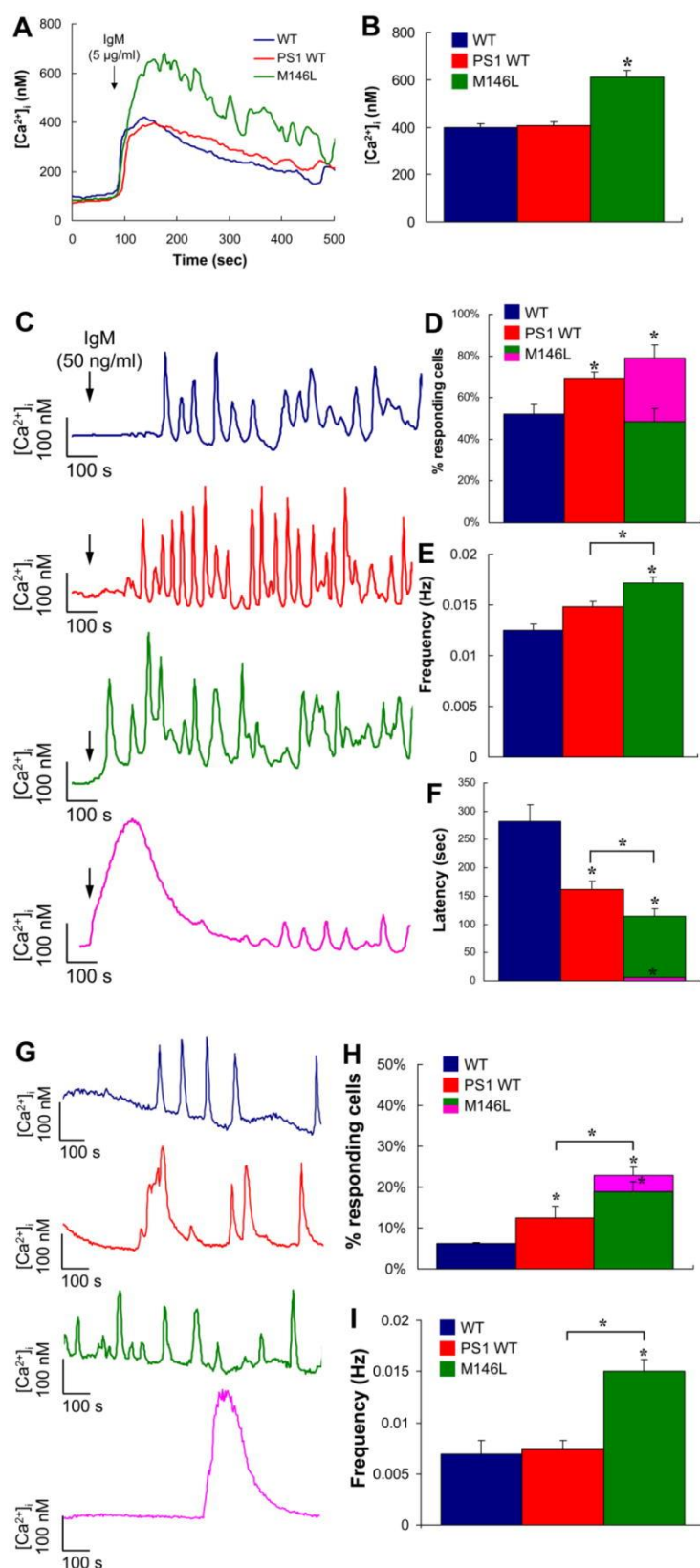
U radu je opisana interakcija između PS1 i IP_3R , s posebnim naglaskom na učinke mutiranog PS1-M146L. Ova mutacija presenelina pokazuje ‘‘*gain of function*’’ učinak, odnosno povećava aktivnost IP_3R u odnosu na normalni PS1. Eksperimenti su pokazali da se divlji i mutirani PS1 vežu na IP_3R tipa 1 i 3 u Sf9 stanicama, dok su u kortikalnim neuronima mišjih embrionalnih stanica, PS1 proteini bili povezani s IP_3R tipa 1. Mutirani PS1 pojačava

aktivnost IP_3R putem direktne interakcije, što može imati važne posljedice za staničnu signalizaciju i Alzheimerovu bolest. Autori su otkrili da imunoprecipitati PS1 iz uzoraka mišjeg mozga također sadrže IP_3R tipa 1. Ovo dodatno potvrđuje postojanu interakciju između PS1 i IP_3R u različitim staničnim tipovima i biološkim sustavima (Slika 5). Također su istražili učinke presenilina 1 (PS1), uspoređujući divlji tip (WT) i mutirani oblik (M146L), na aktivnost inozitol 1,4,5-trifosfatnih receptora (IP_3R) u DT40 stanicama kokoši. U stanicama koje eksprimiraju PS1-WT, aktivnost IP_3R ostala je nepromijenjena ($P_o = 0,57$ u odnosu na 0,53 kod kontrolnih stanica). Mutirani PS1-M146L značajno je povećao aktivnost kanala ($P_o = 0,83$, $p < 0,01$), produžujući njegovo otvoreno stanje. Pri nižim koncentracijama IP_3 (100 nM), mutirani PS1 povećao je aktivnost kanala 4 puta, dosegnuvši razine kao kod zasićenih uvjeta u kontrolnim stanicama. Mutacija PS1-M146L pojačava aktivnost IP_3R , dovodeći do pretjeranog signaliziranja kalcija. Ovo potvrđuje ranija istraživanja u Sf9 stanicama, sugerirajući da PS1 mutacije široko utječu na IP_3R funkciju u različitim staničnim modelima (17).



Slika 5: Westernska metoda otiska: (A) Prikazani su imunoprecipitati lizata Sf9 koeksprimirajući PS1-WT i PS1-M146L (B) Prikazani su imunoprecipitati lizata Sf9 koeksprimirajući PS2-WT i PS1-N141I; sa štakorskim IP_3R izorfomama 1 ili 3; eksprimirani proteini su zapisani s gornje strane a korištena antitijela s desne strane (C) Prikazani su imunoprecipitati iz lizata mišjeg mozga (12).

Ekspresija mutanta PS1, posebice M146L varijante, vodi k pojačanom Ca^{2+} -signaliziranju i pri niskim i visokim koncentracijama agonista, ukazujući da i minimalna stimulacija (zbog određene niske koncentracije korištenog agonista) može biti okidač za značajno jače oslobađanje Ca^{2+} . Slika 6 prikazuje rezultate gdje DT40 stanice eksprimiraju PS1-M146L, te imaju značajno povišenu koncentraciju Ca^{2+} kada su stimulirane sa anti-IgM protutijelima. Točnije, tijekom jake stimulacije (koncentracija anti-IgM protutijela od 5 $\mu\text{g/ml}$), maksimum/pik u odgovoru Ca^{2+} u PS1-M146L stanicama je bio 1,5 puta veći nego u kontroli ili PS1-WT eksprimiranim stanicama. Kada su stimulirali sa nižom koncentracijom anti-IgM protutijela (50 ng/ml), veći postotak PS1-M146L stanica je eksprimiralo pretjerani oscilatorni odgovor Ca^{2+} , u usporedbi sa kontrolnim stanicama. Taj fenomen naglašava da i minimalne koncentracije kod PS1-M146L stanica uzrokuju pretjerano otvaranje IP_3R (12). U konačnici autori ovo rada predlažu da interakcija između presenilina i IP_3R , značajno utječe na signaliziranje kalcijem u patologiji Alzheimerove bolesti, da izmijenjeno signaliziranje Ca^{2+} posredovano IP_3R zbog mutiranih presenilina u nasljednoj Alzheimerovoj bolesti, uključuje pojačano sintezu i nakupljanje $\text{A}\beta$. Predlažu potencijalne mete za terapijsko liječenje ove teške bolesti. Za buduće eksperimente, potrebno je dublje istražiti fiziološke implikacije njihovih rezultata, posebno u neuronalnom kontekstu te proučavati na koje sve načine disregulacija kalcijevog signaliziranja utječe na patologiju Alzheimerove bolesti (12).



Slika 6: Prikaz rezultata pojačanog signaliziranja Ca^{2+} u mutantima PS eksprimirani u DT40 staničnoj liniji. (A i B) Odgovor (u obliku promjene koncentracije kalcijevih iona) na jaku stimulaciju BCR protutijelom na DT40 staničnoj liniji (C do F) Odgovor na slabu stimulaciju BCR protutijelom na DT40 staničnoj liniji (12).

5 Zaključak

Kalcijev ion je esencijalan posrednik za mnogobrojne procese koji se događaju u stanici. Promjena u koncentraciji ovog iona, potiče niz signala koji pokreću stanične događaje poput mišićne kontrakcije, sekrecije hormona i neurotransmitera i fertilizacije oocita. Ca^{2+} ioni mogu ulaziti u stanicu pomoću specifičnih kanala na plazmatskoj membrani, a isto tako otpuštaju se iz unutarstaničnih skladišta putem određenih kanala smještenih na membranama staničnih organela. Organel koji sadrži najveću koncentraciju Ca^{2+} , pa prema tome je i jedan od bitnijih u mehanizmu Ca^{2+} signaliziranja, je endoplazmatski retikulum. Posebni podražaj aktivira mehanizme za mobilizaciju Ca^{2+} u citoplazmu. Sam kalcijev ion djeluje kao glasnik, potičući brojne procese osjetljive na Ca^{2+} . Na kraju kako bi se stanica vratila u mirovanje, deaktivirajući mehanizmi (pumpe i izmjenjivači) će ukloniti Ca^{2+} iz citoplazme i vratiti stanicu u stanje prije podražaja. U raznim istraživanjima, pokazalo se da disregulacija u signaliziranju kalcijem uzrokuje razne bolesti. Ovo je opisano istraživanje pokazalo da kod nasljedne Alzheimerove bolesti, mutanti presenilina (PS1-M146L i PS2-N141) uzajamno djeluju s IP_3R te pojačavaju njegovo otvaranje. Ova interakcija uzrokuje pojačano oslobađanje Ca^{2+} iz endoplazmatskog retikuluma, kada je razina IP_3 i zasićena i suboptimalna. Autori ističu potencijalne probleme za buduća istraživanja koji su vezani za kontroliranje varijabli, poput eksprimirajuće razine IP_3R i presenilina u staničnim linijama. Također, potrebno je proučavati izmijenjeno signaliziranje kalcijem i u sporadičnim oblicima Alzheimerove bolesti. Naime, brojna istraživanja upućuju na to da terapije usmjerene na receptore povezane s kalcijem mogu preokrenuti patološke promjene povezane s Alzheimerovom bolešću.

6 LITERATURNI IZVORI

1. Bootman MD, Bultynck G. Fundamentals of Cellular Calcium Signaling : A primer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2020.;1–16.
2. Ge M, Zhang J, Chen S, Huang Y, Chen W, He L ZY. Role of Calcium Homeostasis in Alzheimer ' s Disease. Neuropsychiatr Dis Treat. 2022.;487–98.
3. Giorgi C, Danese A, Missiroli S, Patergnani S, Pinton P. Calcium Dynamics as a Machine for Decoding Signals. Trends Cell Biol. 2018.;xx:1–16.
4. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000.;1(October).
5. Joseph SK. Role of Thiols in the Structure and Function of Inositol Trisphosphate Receptors. 1. izd. Sv. 66, Curr Top Membr. Elsevier Inc.; 2010. 299–322 str.
6. James W Putney J. Ca²⁺ Signaling. U: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999.
7. Berridge MJ. The inositol triphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. Physiol Rev. 2016.;1261–96.
8. Berridge KC, Robinson TE. Liking, Wanting and the Incentive-Sensitization Theory of Addiction. Am Psychol. 2017.;71(8):670–9.
9. Prole DL, Taylor CW. Structure and Function of IP 3 Receptors. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2019.;1–17.
10. Kellie A. Woll FVP. Calcium-release channels: Structure and function of IP3 receptors and ryanodine. Physiol Rev. 2022.;102(1):209–68.
11. Zhuang S, Bridges D, Grigorenko E, Mccloud S, Boon A, Hampson RE, i ostali. Cannabinoids produce neuroprotection by reducing intracellular calcium release from ryanodine-sensitive stores. Neuropharmacology. 2005.;48:1086–96.
12. King-Ho Cheung , Diana Shineman, Marioly Müller, César Cárdenas, Lijuan Mei, Jun Yang, Taisuke Tomita, Takeshi Iwatsubo, Virginia M-Y Lee JKF. Mechanism of Ca²⁺ Disruption in Alzheimer ' s Disease by Presenilin Regulation of InsP 3 Receptor Channel Gating. Neuron. 2008.;871–83.
13. Oliveira AMM, Bading H, Mauceri D. Dysfunction of neuronal calcium signaling in aging and disease. Cell Tissue Res. 2014.;381–3.
14. Schäfer MKE, Pfeiffer A, Jaekel M, Pouya A, Dolga AM, Methner A. Regulators of mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in cerebral ischemia. Cell Tissue Res.

2014.;357(2):395–405.

15. Karran E, Strooper B De. The amyloid hypothesis in Alzheimer disease: new insights from new therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2021.;21:306–18.
16. Anatoly A Starkov FMB. Portal to Alzheimer’s disease. *Nat Med.* 2015.;14(10):1020–1.
17. Sugawara H, Kurosaki M, Takata M, Kurosaki T. Genetic evidence for involvement of type 1 , type 2 and type 3 inositol 1 , 4 , 5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J.* 1997.;16(11):3078–88.