Поиск фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы для лечения болезни Гоше

Копытова А.Э.¹, Николаев М.А.¹, Богданова Д.А.¹, Сенкевич К.А.¹, Байдакова Г.В.², Большакова О.И.¹, Саранцева С.В.¹, Рычков Г.Н.¹, Чеблоков А.А.¹, Ибатуллин Ф.М.¹, Милиухина И.В.^{1,3}, Захарова Е.Ю.², Пчелина С.Н.^{1,3}, Емельянов А.К.¹

1 — Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» 188300, г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1

2 — Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова 115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

3 — Институт экспериментальной медицины» 197376, г. Санкт-Петербург, улица Академика Павлова, д. 12

Мутации в гене лизосомного фермента глюкоцереброзидазы (GBA), приводящие к дисфункции фермента глюкоцереброзидазы (GCase), в гомозиготном состоянии вызывают болезнь Гоше (БГ), а в гетерозиготном состоянии повышают риск развития болезни Паркинсона (БП). Обсуждается использование фармакологических шаперонов (ФС) GCase для терапии как БГ, так и GBA-ассоциированной БП (GBA-БП). Используя ФС амброксол мы показали увеличение ферментативной активности GCase и снижение концентрации лизосфинголипидов HexSph в культуре первичных макрофагов пациентов с БГ и GBA-БП. Впервые проведена оценка эффективности новых химических соединений, модификаций ранее описанного аллостерического ФС.

Ключевые слова: GBA, болезнь Гоше, GCase, болезнь Паркинсона, лизосфинголипиды

Для цитирования: Копытова А.Э., Николаев М.А., Богданова Д.А., Сенкевич К.А., Байдакова Г.В., Большакова О.И., Саранцева С.В., Рычков Г.Н., Чеблоков А.А., Ибатуллин Ф.М., Милиухина И.В., Захарова Е.Ю., Пчелина С.Н., Емельянов А.К. Поиск фармакологических шаперонов глюкоцереброзидазы для лечения болезни Гоше. *Медицинская генетика* 2020; 19(7): 83-84.

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.07.83-84

Автор для корреспонденции: Копытова Алена Эдуардовна; **e-mail:** kopytovaalena@mail.ru

Финансирование. Исследование поддержано грантом РФФИ № 17-75-20159.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила: 20.05.2020

Pharmacological chaperones glucocerebrosidase as treatment of Gaucher disease

Kopytova A.E.¹, Nikolaev M.A.¹, Bogdanova D.A.¹, Senkevich K.A.¹, Baydakova G.V.², Bolshakova O.I.¹, Sarantseva S.V.¹, Rychkov G.N.¹, Cheblov A.A.¹, Ibatullin F.M.¹, Miliukhina I.V.^{1,3}, Zakharova E. Yu.², Pchelina S.N.^{1,3}, Emelyanov A.K.¹

1 — Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute» 1, mkr., Gatchina 188300, Russia,

2 — Research Centre for Medical Genetics Moskvorechye st., 1, 115522, Moscow, Russia

3 — Institute of Experimental Medicine Acad. Pavlov str., 12, St. Petersburg, 197367, Russia,

Gaucher disease (GD), caused by GBA mutations, encodes lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCase). Pharmacological chaperones could potentially enhance GCase activity and treat GD and PD linked to mutations in the GBA gene (GBA-PD). Using ABX as pharmacological chaperone for macrophages derived from GD and GBA-PD patients we observed significantly enhanced GCase activity and decrease of HexSph concentration. For the first time was evaluated the effectiveness of chemical modifications of the previously described allosteric pharmacological chaperone.

Key words: GBA, Gaucher disease, GCase, Parkinson disease, lysosphingolipids

For citation: Kopytova A.E., Nikolaev M.A., Bogdanova D.A., Senkevich K.A., Baydakova G.V., Bolshakova O.I., Sarantseva S.V., Rychkov G.N., Cheblov A.A., Ibatullin F.M., Miliukhina I.V., Zakharova E. Yu., Pchelina S.N., Emelyanov A.K. Pharmacological chaperones glucocerebrosidase as treatment of Gaucher disease. *Medical genetics*. 2020; 19(7): 83-84. (In Rus)

DOI: 10.25557/2073-7998.2020.07.83-84

Corresponding author: Kopytova Alena Eduardovna; **e-mail:** kopytovaalena@mail.ru

Funding. The research was supported by the Russian Science Foundation grant No. 17-75-20159.

Conflict of interest. The authors have no actual or potential conflict of interest.

Accepted: 20.05.2020

Мутации в гене *GBA*, кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), приводят к дефициту соответствующего фермента и развитию болезни Гоше (БГ). БГ относится к классу лизосомных болезней накопления (ЛБН) и характеризуется дефицитом активности фермента GCase и внутриклеточным накоплением лизосфинголипидов, в частности глюкозилцерамида (GlcCer) и его деацетилированной формы — глюкозилсфингозина (GlnSph), в первую очередь в лизосомах макрофагов. Пациенты с БГ, а также гетерозиготные носители мутаций в гене *GBA* имеют высокий риск развития БП (риск повышен в 7-8 раз). Общность патогенеза данных заболеваний делает перспективным рассмотрение стратегий, направленных на лечение БГ, в качестве нейропротекторной терапии при БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA* (*GBA*-БП) [1].

На сегодняшний день разработаны два подхода для терапии БГ — фермент заместительная терапия (ФЗТ) и субстрат редуцирующая терапия (СРТ). Важно отметить, что нейрональные формы заболевания в настоящее время не имеют лечения, в связи с неспособностью рекомбинантного белка проникать через гематоэнцефалический барьер. Поскольку наиболее распространенные мутации в гене *GBA* расположены вне активного сайта фермента, для повышения ферментативной активности GCase представляется перспективным использование химических соединений, которые способствуют правильной сборке белка GCase и последующей транслокации фермента в лизосомы. Существует два типа фармакологических шаперонов (ФШ): молекулы, выступающие в качестве конкурентных ингибиторов GCase (связываются с активным центром GCase) и аллостерические активаторы (связываются с аллостерическим центром). Амброксол — метаболит бромгексина, который используется уже более 30 лет как муколитическое средство, в настоящее время рассматривается как перспективный ФШ, связывающийся с активным сайтом фермента. Особый интерес представляет разработка неингибирующих аллостерических ФШ в качестве потенциальных активаторов ферментативной активности GCase.

Цель: оценить эффективность амброксола, а также химических модификаций ранее описанного аллостерического фармакологического шаперона NCGC00241607 [2] на восстановление активности GCase и снижение концентрации сфинголипидов в первичной культуре макрофагов макрофагах пациентов с БГ и *GBA*-БП.

Материалы и методы

У пациентов с БГ (N=12), *GBA*-БП (N=6) и лиц контрольной группы (N=30) была собрана мононуклеарная фракция из периферической крови с помощью градиента фикола. Для дальнейшей дифференцировки в макрофаги культивировали клетки в среде RPMI 1640 (Gibco, USA), содержащей: 10% FBS (Gibco, USA), 1% гентамицин (Gibco, USA), 10 нг/мл колониестимулирующий фактор макрофагов (М-КСФ) (Sigma-Aldrich, USA). На 4-ый день культивирования добавля-

ли ФШ: ABX (Sigma-Aldrich, USA) — 50 мкмоль, аллостерический ФШ NCGC00241607, как описано ранее [3] и два соединения, являющиеся химическими модификациями данного ФШ — 4 мкмоль. Ферментативную активность GCase и концентрацию HexSph оценивали методом tandemного масс-спектрометрического анализа [3]. Транслокацию GCase (Alexa Fluor 488) в лизосомы (маркер LAMP2 (Cy3)) оценивали в макрофагах пациентов с использованием лазерного конфокального микроскопа Leica TCS-SP5 (объектив x63) (Leica, Germany).

Результаты

На выборке пациентов с БГ, а также с *GBA*-БП мы показали увеличение активности GCase и снижение концентрации HexSph в первичной культуре макрофагов пациентов с БГ и *GBA*-БП при добавлении ABX, что подтверждает предположение о перспективности использования данного ФШ для терапии нейронопатических форм БГ и *GBA*-БП. При конфокальной микроскопии было показано увеличение колокализации GCase и LAMP2 в макрофагах пациентов с БГ после добавления ABX. Методом компьютерного моделирования были подобраны новые малые молекулы, способные восстановить активность GCase в результате связывания с аллостерическим сайтом на поверхности фермента GCase. Путём химического синтеза были получены 2 модификации ранее описанного аллостерического ФШ NCGC00241607, который показал свою эффективность на фибробластах пациентов с БГ [2]. На макрофагах пациентов с *GBA*-БП мы показали, что модификация N2 эффективно восстанавливает активность GCase. Необходимы дополнительные исследования данной модификации *in vitro* на клеточных культурах пациентов с БГ.

Выводы

ABX повышает активность GCase и снижает концентрацию лизосфинголипидов в первичной культуре макрофагов пациентов с БГ и *GBA*-БП. Впервые оценена эффективность химических модификаций ранее описанного ФШ NCGC00241607. Модификация N2 может потенциально стать новым ФШ для терапии БГ и *GBA*-БП.

Литература/References

1. Do J., McKinney C., Sharma P., Sidransky E. Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Mol Neurodegener.* 2019;14(1). doi:10.1186/s13024-019-0336-2.
2. Aflaki E., Borger D., Moaven N., et al. A New Glucocerebrosidase Chaperone Reduces α -Synuclein and Glycolipid Levels in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons from Patients with Gaucher Disease and Parkinsonism. *J Neurosci.* 2016;36(28):7441–7452. doi:10.1523/jneurosci.0636-16.2016.
3. Nikolaev M.A., Kopytova A.E., Emel'yanov A.K., et al. Human peripheral blood macrophages as a model for studying glucocerebrosidase dysfunction. *Cell and Tissue Biology.* 2019; 13(2): 100–106.