

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.12.18-22>

Дисфункция глюкоцереброзидазы и накопление альфа-синуклеина – патофизиологический дуэт при GBA-ассоциированной болезни Паркинсона

Николаев М.А.^{1,2}, Копытова А.Э.^{1,2}, Руденок М.М.⁴, Изюмченко А.Д.¹, Журавлев А.С.¹, Милюхина И.В.³, Байдакова Г.В.⁵, Шадрина М.И.⁴, Захарова Е.Ю.⁵, Сломинский П.А.⁴, Емельянов А.К.^{1,2}, Пчелина С.Н.^{1,2}

- 1 – ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
188350, Ленинградская обл., г. Гатчина, микрорайон Орлова Роща
- 2 – ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197101, г. Санкт-Петербург, ул. Л.Толстого, д. 6/8
- 3 – Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева РАН
197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 9
- 4 – ФГБУ «Институт молекулярной генетики» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
123182, г. Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2 5
- 5 – ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1

Глюкоцереброзидаза (GCase) – лизосомный фермент, кодируемый геном *GBA*. Мутации в гене *GBA* являются наиболее распространенным генетическим фактором риска болезни Паркинсона (БП). Гомозиготное носительство мутаций в гене *GBA* приводит к развитию болезни Гоше (БГ). Было показано, что мутации в гене *GBA* могут влиять на накопление белка альфа-синуклеина, агрегация которого рассматривается в настоящее время как ключевое звено патогенеза БП. В данном исследовании нами была сопоставлена ферментативная активность GCase, концентрация субстрата фермента HexSph и уровень белка альфа-синуклеина в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с БГ, GBA-ассоциированной БП, бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA* (*GBA*-носителей), а также в присутствии селективного ингибитора GCase кондуритол-В-эпоксида (CBE) как на первичной культуре макрофагов контрольной группы пациентов, так и в клетках мозга модельных животных (мышей). В результате проведенного исследования на первичной культуре макрофагов, а также в клетках мозга мышиной модели показано, что при снижении активности GCase происходит накопление субстрата HexSph. На модельных животных нами впервые показано влияние ингибирования функции GCase на накопление олигомерных форм альфа-синуклеина. В макрофагах носителей мутаций в гене *GBA* было показано понижение активности GCase и накопление субстрата вне зависимости от наличия патологии. Таким образом, исходя из полученных данных можно предположить, что выраженная дисфункция GCase сопровождается накоплением лизосфинголипидов и изменением катаболизма альфа-синуклеина как в клетках первичной культуры макрофагов человека, так в клетках модельных животных.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, *GBA*, глюкоцереброзидаза, альфа-синуклеин, лизосфинголипиды.

Для цитирования: Николаев М.А., Копытова А.Э., Руденок М.М., Изюмченко А.Д., Журавлев А.С., Милюхина И.В., Байдакова Г.В., Шадрина М.И., Захарова Е.Ю., Сломинский П.А., Емельянов А.К., Пчелина С.Н. Дисфункция глюкоцереброзидазы и накопление альфа-синуклеина – патофизиологический дуэт при GBA-ассоциированной болезни Паркинсона. *Медицинская генетика* 2022; 21(12): 18-22.

Автор для корреспонденции: Николаев М.А.; e-mail: Nikolaev_MA@pnpi.nrcki.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания по теме: «Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения» (регистрационный номер №121060200125-2).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 19.11.2022

Glucocerebrosidase dysfunction and alpha-synuclein accumulation – a pathophysiological duet in GBA-associated Parkinson's disease

Nikolaev M.A.^{1,2}, Kopytova A.E.^{1,2}, Rudenok M.M.⁴, Izyumchenko A.D.¹, Jouravlev A.S.¹, Miliukhina I.V.³, Baydakova G.V.⁵, Shadrina M.I.⁴, Zakharova E.Y.⁵, Slominsky P.A.⁴, Emelyanov A.K.^{1,2}, Pchelina S.N.^{1,2}

- 1 – Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute»
Mkr. Orlova Rostcha, Gatchina, St. Petersburg, 188350, Russian Federation
- 2 – Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University
6/8, L.Tolstogo str., St. Petersburg, 197101, Russian Federation
- 3 – Institute of the Human Brain RAS
9, Akademika Pavlova str., St. Petersburg, 197376, Russian Federation
- 4 – Institute of Molecular Genetics of National Research Centre «Kurchatov Institute»
2, Akademika Kurchatova square, Moscow, 123182, Russian Federation
- 5 – Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye str., Moscow, 115522, Russian Federation

Glucocerebrosidase (GCase) is a lysosomal enzyme encoded by the *GBA* gene, mutations in which are the most common genetic risk factor for Parkinson's disease (PD). Homozygous carriage of mutations in the *GBA* gene leads to the development of Gaucher disease (GD). It has been shown that mutations in the *GBA* gene can affect the accumulation of alpha-synuclein protein. Its aggregation is currently considered as a key link in the pathogenesis of PD. In this study, we compared the enzymatic activity of GCase, the concentration of the HexSph enzyme substrate and the level of alpha-synuclein protein in the primary culture of macrophages of patients with GD, GBA-associated PD, asymptomatic carriers of mutation in the *GBA* gene and control group individuals in the presence of a selective GCase inhibitor conduritol-B-epoxide, as well as in the brain cells of model animals with lysosome dysfunction. As a result of the study conducted on the primary culture of macrophages, as well as on animal models, it was shown that lysosome dysfunction leads to decreased GCase activity and HexSph accumulation. In this study on model animals, we have shown for the first time the effect of GCase function inhibition on the oligomeric forms of alpha-synuclein accumulation.

Keywords: Parkinson's disease, *GBA*, glucocerebrosidase, alpha-synuclein, lysosphingolipids.

For citation: Nikolaev M.A., Kopytova A.E., Rudenok M.M., Izyumchenko A.D., Jouravlev A.S., Miliukhina I.V., Baydakova G.V., Shadrina M.I., Zakharova E.Y., Slominsky P.A., Emelyanov A.K., Pchelina S.N. Glucocerebrosidase dysfunction and alpha-synuclein accumulation – a pathophysiological duet in GBA-associated Parkinson's disease. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2022; 21(12): 18-22. (In Russ.)

Corresponding author: Nikolaev M.A., **e-mail:** Nikolaev_MA@pnpi.nrcki.ru

Funding. The study was carried out according to the state task under the project: «Study of the molecular and cellular components of the pathogenesis of socially significant diseases for the development of methods for early diagnosis and treatment» (registration number No. 121060200125-2).

Conflict of interest. The authors declare no conflicts of interest.

Accepted: 19.11.2022

Введение

Глюкоцереброзидаза (GCase) – лизосомный фермент, который кодируется геном *GBA*, участвует в метаболизме сфинголипидов, катализируя распад глюкозилцерамида (GlcCer) и глюкозилсфингозина (GlcSph). Мутации в гене *GBA* приводят к развитию болезни Гоше (БГ) и являются наиболее распространенным генетическим фактором высокого риска развития болезни Паркинсона (БП) (до 7-8 раз) в различных популяциях [1, 2]. В основе патогенеза БП лежит накопление и агрегация белка альфа-синуклеина в дофаминергических нейронах черной субстанции головного мозга и, как следствие, их гибель. Молекулярный механизм развития GBA-ассоциированной БП (GBA-БП) остается неизвестным, однако предполагается, что дисфункция лизосом может нарушать в клетках ката-

болизм альфа-синуклеина. Изучение взаимосвязи накопления альфа-синуклеина и нарушения функции GCase является важным шагом в понимании патогенеза БП.

Целью настоящего исследования стала оценка влияния дисфункции глюкоцереброзидазы на накопление белка альфа-синуклеина в первичной культуре макрофагов человека, а также в клетках мозга модельных животных (мышей).

Методы

В данное исследование вошло 14 пациентов с GBA-БП (средний возраст 59,9±2,5 года, 41% мужчин, мутации гена *GBA*: 7 N370S/WT, 7 L444P/WT), 32 индиви-

дуума контрольной группы (средний возраст $62,6 \pm 10,3$ лет, 41% мужчин) 15 бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA* (*GBA*-носители) (средний возраст $55,2 \pm 2,8$ лет, 38% мужчин, мутации гена *GBA*: 6 N370S/WT, 5 L444P/WT, 1 R120W/WT, 1 G241R/WT, 1 M124T/WT, 1 N227S/WT) и 19 пациентов с БГ (средний возраст $37,2 \pm 2,7$ лет, 42% мужчин, мутации гена *GBA*: 8 N370S/L444P, 2 N370S/N370S, 2 N370S/R120W, 1 L444P/L444P, 1 N370S/W184R, 1 N370S/c.84dupG, 1 N370S/G202R, 1 N370S/V375L, 1 L444P/M124T, 1 N370S/-).

Мононуклеарная фракция была получена из образцов периферической крови путем градиентного центрифугирования в растворе фиколла. Полученные клетки ресуспендировали в культуральной среде RPMI-1640 с добавлением 10% FBS, 1% стрептомицин-пенициллина и 10 нг/мл фактора роста макрофагов. Клетки культивировали в течение 8 дней при стандартных условиях. Для получения дисфункции GCase к дифференцированным макрофагам лиц контрольной группы (N=8) на четвертый день культивирования в среду добавляли селективный ингибитор кондуритол-В-эпоксид (CBE) в конечной концентрации в 150 нг/мл и культивировали еще 4 дня.

Кроме того, в настоящем исследовании были созданы модельные животные (мыши) с дисфункцией GCase. В исследование были включены самцы линии C57BL/6 (N=16, средний возраст 5-6 недель, вес составлял 22-26 г). Всем мышам производились внутрибрюшинные инъекции селективного ингибитора GCase CBE в концентрации 100 мг/кг (N=8) и аналогичного объема 0,9% NaCl группе контроля (N=8). Вывод животных из эксперимента был проведен через 5 дней (для оценки концентрации GCase и уровня HexSph N=10) и через 14 дней (для оценки уровня олигомерного альфа-синуклеина N=6) после инъекций путем цервикальной дислокации с последующим извлечением тканей лобной коры, стриатума и черной субстанции.

Оценка ферментативной активности GCase и концентрации субстрата гексозилсфингозина (HexSph) (смесь GlcSph и галактозилсфингозина (GalSph)) в макрофагах периферической крови индивидуумов всех исследуемых групп, а также в лизатах клеток мозга модельных животных была проведена методом ВЭЖХ-МС/МС. Оценка уровня общего альфа-синуклеина и его олигомерных форм была проведена методом иммуноферментного анализа (ИФА) с набором Human alpha-synuclein ELISA kit, а также методом вестерн-блоттинга. При вестерн-блоттинге для электрофореза были использованы StainFree гели (Bio-Rad,

США), а нормировка полученных результатов проводилась на общий белок. Экспериментальные данные представлены в виде медианы (мин-макс). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS 21.0

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования нами были оценены активность GCase и концентрация HexSph в первичной культуре макрофагов пациентов с *GBA*-БП, *GBA*-носителей, пациентов с БГ и лиц контрольной группы, в том числе в макрофагах, культивируемых в присутствии CBE.

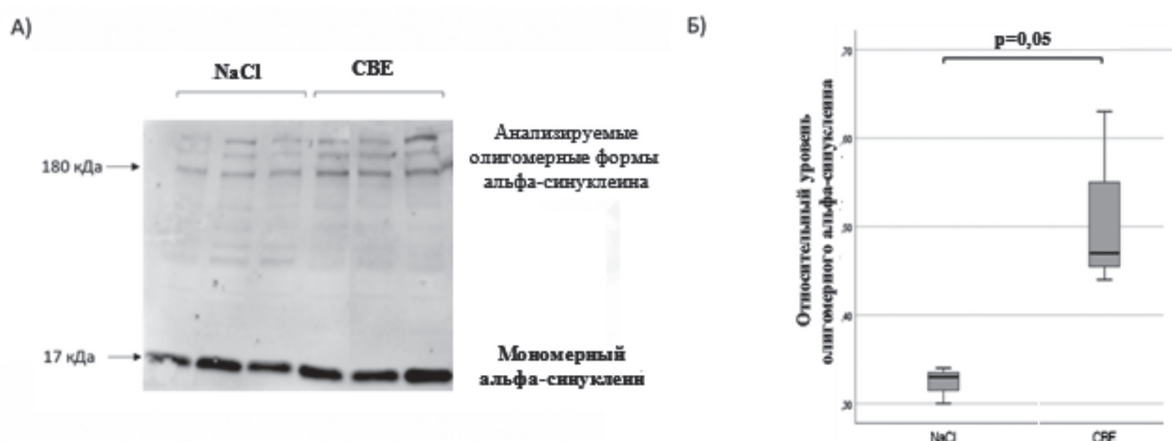
Показано статистически значимое снижение активности GCase и увеличение концентрации HexSph в первичной культуре макрофагов носителей мутаций в гене *GBA* по сравнению с контролем вне зависимости от наличия БП (табл. 1) (GCase: *GBA*-БП $p=0,026$, *GBA*-носители $p<0,0016$; HexSph: *GBA*-БП $p=0,026$, *GBA*-носители $p<0,001$). В первичных макрофагах пациентов с БГ наблюдалось статистически значимое снижение активности GCase и повышение концентрации HexSph по сравнению со всеми исследуемыми группами пациентов ($p<0,0001$). Было показано увеличение концентрации общего альфа-синуклеина в первичной культуре макрофагов носителей мутаций в гене *GBA* (*GBA*-БП $p=0,005$ и *GBA* $p<0,0001$) по сравнению с контролем (табл. 1).

На втором этапе нами проведены исследования по влиянию селективного ингибирования фермента GCase как в первичной культуре макрофагов, так и на модельных животных. Выявлено снижение активности в первичной культуре макрофагов представителей контрольной группы, культивируемых в присутствии CBE, по сравнению с клетками, необработанными данным соединением ($p<0,0001$).

Нами было показано статистически значимое снижение активности GCase и повышение концентрации HexSph в кортексе, стриатуме и черной субстанции мозга мышей с инъекцией CBE по сравнению с контрольной группой животных (GCase: $p=0,009$, $p=0,034$, $p=0,013$, соответственно; HexSph: $p=0,027$, $p=0,034$, $p=0,0014$, соответственно) (табл. 2).

Обнаружено статистически значимое повышение уровня олигомерного альфа-синуклеина в лизатах ткани стриатума мозга мышей с инъекцией CBE по сравнению с контрольной группой животных ($p=0,05$) (рисунок).

Согласно последним данным литературы, дисфункция GCase может приводить к нарушению работы лизо-



Уровень олигомерного альфа-синуклеина в лизатах ткани стриатума мышей линии C57BL/6 при введении NaCl (контроль) и CBE: А) пример результатов вестерн-блоттинга; Б) относительный уровень олигомерного альфа-синуклеина в виде медианы с межквартильным интервалом.

Oligomeric alpha-synuclein level in striatal tissue lysates of C57BL/6 mice after injection of NaCl (control) and CBE: A) example of Western blot results; B) the relative level of oligomeric alpha-synuclein as a median with an interquartile interval.

Таблица 1. Ферментативная активность GCase, концентрация HexSph и общего альфа-синуклеина в первичной культуре макрофагов индивидуумов исследуемых групп

Table 1. Enzymatic activity of GCase, concentration of HexSph and total alpha-synuclein in the primary culture of macrophages of individuals of the studied groups

	Макрофаги				
	БГ	ГВА-БП	ГВА-носители	Контроль с CBE	Контроль
Активность GCase, мМоль/л/ч	0,52 (0,03 – 3,11)*	8,3 (1,63-27,67)*	4,05 (0,48 – 46,96)*	0,06 (0,002-0,431)*	11,62 (4,7-97,95)
Концентрация HexSph, нг/мл	29,63 (7,69 – 219,97)*	2,73 (0,06 – 86,66)*	1,74 (0,11 – 6,48)*	80,87 (44,7-158,57)*	0,02 (0,01 – 7,31)
Концентрация общего альфа-синуклеина, нг/мкг	0,39 (0,14- 0,68)	1,14 (0,27 – 5,99)*	1,53 (0,12 – 4,91)*	0,80(0,48-3,43)	0,41 (0,09 – 1,6)

Примечание: *-p<0,05 по отношению к контрольной группе.

Таблица 2. Активность GCase, концентрация HexSph в кортексе, стриатуме и в черной субстанции мозга мышей линии C57BL/6

Table 2. GCase activity, HexSph concentration in the cortex, striatum, and substantia nigra of the brain of C57BL/6 mice

		Кортекс	Стриатум	Черная Субстанция
Активность GCase, мМоль/л/ч	NaCl	19,50 (17,18-34,61)	25,46 (17,88-38,89)	44,10 (33,44-48,11)
	CBE	0,28 (0,25-0,64)*	2,56 (1,00-3,10)*	6,99 (5,441-11,03)*
Концентрация HexSph, нг/мл	NaCl	1,93 (0,37-5,38)	5,41 (4,39-6,53)	5,03 (1,31-9,88)
	CBE	6,89 (1,20-11,70)*	7,22 (1,38-12,98)*	16,19 (7,65-22,95)*

Примечание: *-p<0,05 по отношению к контрольной группе.

сом и накоплению в клетках различных липидов, конъюгированных с глюкозой. В последние годы обсуждается прямое влияние лизосфинголипидов на стабилизацию олигомерных форм альфа-синуклеина [3–5]. Эти данные позволяют предположить, что в основе развития БП у носителей мутаций в гене *GBA* может лежать механизм прямой обратной связи, по которому снижение активности GCase и накопление ее субстратов может способствовать олигомеризации альфа-синуклеина, в то время как сами по себе агрегированные формы данного белка могут приводить к снижению активности фермента [3]. В настоящем исследовании на модельных животных нами впервые показано влияние ингибирования функции GCase на накопление олигомерных форм альфа-синуклеина. Ранее в подобном исследовании было выявлено снижение активности GCase, а также увеличение уровня общего альфа-синуклеина в клетках мозга при инъекции мышам СВЕ [5]. Также в настоящем исследовании нами было впервые показано увеличение концентрации общего альфа-синуклеина в первичной культуре макрофагов носителей мутаций в гене *GBA* по сравнению с индивидуумами контрольной группы, однако данных изменений не было обнаружено в группе пациентов с БГ. Ранее была показана прямая корреляция концентрации альфа-синуклеина с возрастом у здоровых индивидуумов [6].

Заключение

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о возможности моделирования дисфункции GCase, как в макрофа-

гах периферической крови человека, так и у животных. Снижение активности GCase у мышей сопровождается накоплением лизосфинголипидов и олигомерных форм альфа-синуклеина в тканях мозга. Мутации в гене *GBA* ассоциированы со снижением ферментативной активности GCase, накоплением субстрата HexSph, повышением концентрации альфа-синуклеина в первичной культуре макрофагов человека независимо от статуса БП. Можно предполагать, что в основе развития БП у носителей мутаций в гене *GBA* лежит влияние повышенного уровня лизосфинголипидов на накопление олигомерных форм альфа-синуклеина.

Литература/References

1. Gegg M.E., Verona G., Schapira A.V. Glucocerebrosidase deficiency promotes release of α -synuclein fibrils from cultured neurons. *Human Molecular Genetics*. 2020;29(10):1716–1728.
2. Emelyanov A.K., Usenko T.S., Tesson C., et al. Mutation analysis of Parkinson's disease genes in a Russian data set. *Neurobiology of Aging*. 2018;71:267.e7–267.e10.
3. Do J., McKinney C., Sharma P., Sidransky E. Glucocerebrosidase and its relevance to Parkinson disease. *Molecular Neurodegeneration*. 2019;14(1).
4. Zunke F., Moise A.C., Belur N.R., et al. Reversible Conformational Conversion of α -Synuclein into Toxic Assemblies by Glucosylceramide. *Neuron*. 2018;97(1):92–107.e10.
5. Mus L., Siani F., Giuliano C., et al. Development and biochemical characterization of a mouse model of Parkinson's disease bearing defective glucocerebrosidase activity. *Neurobiology of Disease*. 2019;124:289–296.
6. Brighina L., Prigione A., Begni B., Galbussera A., Andreoni S., Pioletti R. et al. Lymphomonocyte alpha-synuclein levels in aging and in Parkinson disease. *Neurobiology of Aging*. 2010;31(5):884–885.