

<https://doi.org/10.25557/2073-7998.2022.12.26-29>

Селективное ингибирование киназной активности LRRK2 как подход к терапии болезни Паркинсона

Усенко Т.С.^{1,2}, Башарова К.С.¹, Безрукова А.И.¹, Николаев М.А.^{1,2}, Милыхина И.В.^{2,3}, Байдакова Г.В.⁴, Захарова Е.Ю.⁴, Пчелина С.Н.^{1,2}

- 1 – ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
188350, Россия, 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, Россия, 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 – ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, Россия, ул. Москворечье, д. 1

На сегодняшний день не существует нейропротекторных препаратов для лечения распространённого нейродегенеративного заболевания болезни Паркинсона (БП). Наиболее перспективной для разработки таргетной терапии считается форма БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA* (GBA-БП), как самая распространенная форма БП с известной этиологией. Мутации в гене *GBA*, кодирующем фермент глюкоцереброзидазу (GCase), приводят к снижению активности данного фермента. Ранее было показано, что ингибирование киназной активности LRRK2 ингибитором MLI-2 приводит к увеличению активности GCase. В данном исследовании мы впервые показали влияние ингибитора киназной активности LRRK2 MLI-2 не только на активность GCase, но и на активность других лизосомных ферментов в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов не только с LRRK2-ассоциированной БП (LRRK2-БП), но и с GBA-БП.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, макрофаги периферической крови, ингибитор LRRK2, активность ферментов, *GBA*, LRRK2.

Для цитирования: Усенко Т.С., Башарова К.С., Безрукова А.И., Николаев М.А., Милыхина И.В., Байдакова Г.В., Захарова Е.Ю., Пчелина С.Н. Селективное ингибирование киназной активности LRRK2, как подход к терапии болезни Паркинсона. *Медицинская генетика* 2022; 21(12): 26-29.

Автор для корреспонденции: Усенко Т.С.; e-mail: usenko_ts@pnpi.nrcki.ru

Финансирование. Исследование поддержано грантом РФФИ №22-25-00501.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 19.11.2022

Selective inhibition of LRRK2 activity as an approach to the treatment of Parkinson's disease

Usenko T.S.^{1,2}, Basharova K.S.¹, Bezrukova A.I.¹, Nikolaev M.A.^{1,2}, Miliukhina I.V.^{2,3}, Baydakova G.V.⁴, Zakharova E.Y.⁴, 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, Akadimika Pavlova str., St. Petersburg, 197376, Russian Federation
- 4 – Research Centre for Medical Genetics
1, Moskvorechye str., Moscow, 115522, Russian Federation

To date, there are no neuroprotective drugs for the common neurodegenerative disease, Parkinson's disease (PD). PD associated with mutations in the *GBA* gene (GBA-PD) is the most common form of PD with a known etiology. GBA-PD is considered the most promising for the development of therapy for PD. Mutations in the *GBA* gene encoding the enzyme glucocerebrosidase (GCase) lead to a decrease in the activity of this enzyme. Previously, it was shown that inhibition of LRRK2 kinase activity by MLI-2 inhibitor leads to an increase in GCase activity. In this study, we showed for the first time the effect of the LRRK2 kinase activity inhibitor MLI-2 not only on the activity of GCase, but also on the activity of other lysosomal enzymes in the primary culture of peripheral blood macrophages of patients with LRRK2-associated PD (LRRK2-PD) and GBA-PD.

Keywords: Parkinson's disease, peripheral blood macrophages, LRRK2 inhibitor, enzyme activity, *GBA*, LRRK2

For citation: Usenko T.S., Basharova K.S., Bezrukova A.I., Nikolaev M.A., Miliukhina I.V., Baydakova G.V., Zakharova E.Y., Pchelina S.N. Selective inhibition of LRRK2 activity as an approach to the treatment of Parkinson's disease. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2022; 21(12): 26-29. (In Russ.)

Corresponding author: Usenko T.S., e-mail: usenko_ts@pnpi.nrcki.ru

Funding. The research was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-25-00501.

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

Accepted: 19.11.2022

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) — нейродегенеративное заболевание, в основе патогенеза которого лежат агрегация и накопление белка альфа-синуклеина в черной субстанции головного мозга. БП является гетерогенным заболеванием, не смотря на однородные клинические проявления. Известны две наиболее распространенные наследственные формы БП: БП, ассоциированная с мутациями в гене *LRRK2* (LRRK2-БП), и БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA* (GBA-БП). Распространённость LRRK2-БП, вызываемой мутациями в гене *LRRK2*, кодирующем фермент богатую лейциновыми повторами киназу 2 (LRRK2), составляет среди семейных и спорадических случаев от 1 до 46% в зависимости от популяции [1]. Мутации в гене *GBA*, приводящие в гомозиготном состоянии к развитию самой распространённой лизосомной болезни накопления (ЛБН) болезни Гоше (БГ) за счет снижения активности кодируемого геном *GBA* лизосомного фермента β -глюкоцереброзидазы (GCase) и, как следствие, — к накоплению лизосфинголипидов (глюкозилцелцер амида и глюкоцереброзида), являются фактором высокого генетического риска БП [2, 3]. Молекулярные механизмы GBA-БП и LRRK2-БП остаются неизвестными, что обуславливает отсутствие на сегодняшний день какой-либо нейропротекторной терапии, позволяющей замедлить или остановить гибель нейронов. Терапия, которая разрабатывается для лечения GBA-БП, в настоящее время направлена на увеличение активности фермента GCase [4]. Для лечения LRRK2-БП разрабатываются препараты, ингибирующие киназную активность фермента LRRK2 [5]. Так, например, вещества DNL201 и DNL151, являющиеся ингибитором киназы LRRK2 показали свою эффективность на доклиническом этапе и успешно прошли 1 фазу клинических исследований. Интересно отметить, что в одном исследовании, выполненном на модели дофаминергических нейронов, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека, показано, что ингибирование киназной активности LRRK2 при гетерозиготном носительстве мутаций в гене *GBA* при-

водит к снижению уровня фосфорилированного белка Rab10, который является субстратом LRRK2, и увеличению активности GCase [6].

Цель настоящего исследования заключалась в оценке влияния ингибитора киназной активности LRRK2 MLi-2 на активность лизосомных ферментов в первичной культуре макрофагов пациентов с GBA-БП, пациентов с LRRK2-БП и неврологически здоровых индивидуумов.

Методы

В исследование были включены 2 пациента с GBA-БП (1 — L444P/N, 1 — N370S/N), 2 пациента с LRRK2-БП (2 — G2019S/N) и 2 индивидуума контрольной группы. Все индивидуумы, вошедшие в исследование, являлись лицами женского пола сопоставимыми по возрасту. У каждого индивидуума был осуществлён забор цельной периферической крови с последующим получением мононуклеарной фракции методом градиентного центрифугирования в градиенте раствора фиколла. Полученные мононуклеарные клетки от каждого индивидуума культивировали в трех повторях в среде RPMI-1640 (Corning, США), содержащей 10% FBS (Corning, США), 1% гентамицина (Corning, США) и 10 нг/мл М-CSF (Biolegend, США) в присутствии и без селективного ингибитора киназной активности LRRK2 MLi-2 (Abcam, Англия) в конечной концентрации 100 нг/мл. Эффективность действия MLi-2 на киназную активность LRRK2 оценивали по соотношению нефосфорилированного к фосфорилированному белку Rab10 методом вестерн блоттинга с использованием антител MJF-R23, MJF-R21 (Abcam, UK). Активность лизосомных ферментов (альфа-галактозидазы (GLA), кислой сфингомиелиназы (ASMase), кислой альфа-глюкозидазы (GAA), альфа-L-идуронидазы (IDUA), галактозилцереброзидазы (GALC)) оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в крови, как описано нами ранее [7]. Все эксперименты проводились в трех повторях для каждого индивидуума, включенного в ис-

следование. Расчеты описательных характеристик были проведены с использованием встроенных пакетов R (версия 3.5.1).

Результаты и обсуждение

В ходе анализа медианы активности лизосомных ферментов было показано, что в присутствии ингибитора MLi-2 активность GCase увеличивается в 2,16 и в 2,29 раза в группах пациентов с LRRK2-БП и GBA-БП, соответственно, по сравнению с первичной культурой макрофагов пациентов как с LRRK2-БП, так и с GBA-БП без ингибитора (таблица). Мы впервые в группе пациентов с LRRK2-БП и пациентов с GBA-БП показали увеличение активностей лизосомных ферментов GALC в 4,88 и 2,12 раза соответственно, GAA в 1,35 и 1,31 раза соответственно, GLA в 2,72 и 1,81 раза соответственно, IDUA в 2,69 и в 1,63 раз соответственно по сравнению со значением активности исследуемых ферментов в первичной культуре макрофагов пациентов как с LRRK2-БП, так и с GBA-БП без ингибитора. Интересно отметить, что увеличение активности ASMase наблюдалось у пациентов с LRRK2-БП в первичной культуре макрофагов в присутствии ингибитора MLi-2 в 2,8 раза, но оно не наблюдалось в группе пациентов с GBA-БП. Кратное изменение активности лизосомных ферментов в первичной культуре макрофагов периферической крови индивидуумов контрольной группы в присутствии ингибитора киназной активности

MLi-2 по сравнению с первичной культурой макрофагов периферической крови без ингибитора MLi-2 практически не наблюдалось. Также нами было показано дозозависимое увеличение активности как GCase, так и других исследуемых ферментов (GALC, GAA, GLA, IDUA, ASMase) в первичной культуре макрофагов пациентов с GBA-БП в присутствии ингибитора MLi-2 в различных концентрациях (0 нм/мл, 50 нм/мл, 100 нм/мл) на фоне увеличения уровня белка Rab10 и одновременного снижения уровня его фосфорилированной формы (рисунок). Известно, что белок Rab10 является субстратом LRRK2 и в лизосомном гомеостазе [8]. Ранее было показано, что киназная активность LRRK2 играет прямую роль в регуляции активности GCase посредством фосфорилирования белка Rab10 [6]. Наши результаты позволяют предположить роль LRRK2 в регуляции активности GCase и других лизосомных ферментов (GALC, GAA, GLA, IDUA, ASMase) посредством фосфорилирования белка Rab10.

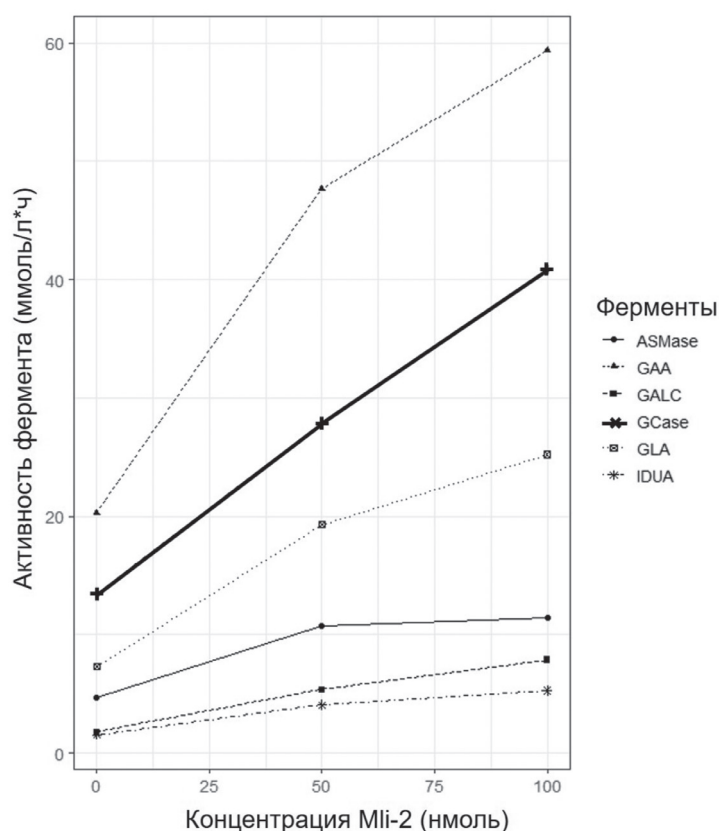
Заключение

Мы подтвердили данные о влиянии ингибитора киназной активности LRRK2 MLi-2 на активность GCase в группе пациентов с GBA-БП и впервые показали влияние данного ингибитора и на активность других лизосомных ферментов в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов как с GBA-БП, так и с LRRK2-БП. Необходимы дальнейшие

Активность лизосомных ферментов в первичной культуре макрофагов

The lysosomal enzymes activity in the primary culture of peripheral blood macrophages

	Активность лизосомных ферментов в первичной культуре макрофагов, ммоль/л/ч					
	GBA-БП		LRRK2-БП		Контроль	
	MLi2 ⁻	MLi2 ⁺	MLi2 ⁻	MLi2 ⁺	MLi2 ⁻	MLi2 ⁺
GCase	12,62 (12,2-13,04)	28,98 (28,7-29,25)	31,07 (20,98-41,16)	67,13 (27,93-106,33)	28,37 (27,27-29,47)	23,24 (21,93-24,55)
GALC	6,11 (5,94-6,28)	12,96 (12,56-13,35)	11,96 (1,89-22,02)	58,41 (4,76-112,06)	9,35 (4,41-14,29)	9,16 (2,56-15,76)
GAA	48,03 (39,74-56,32)	63,08 (62,8-63,35)	71,39 (38,36-104,41)	96,7 (57,42-135,97)	49,28 (43,64-54,92)	43,79 (31,53-56,04)
GLA	12,09 (11,82-12,35)	21,9 (21,24-22,55)	29,43 (8,72-50,14)	80,16 (14,92-145,40)	14,71 (12,93-16,49)	13,91 (11,16-16,65)
IDUA	4,99 (4,29-5,68)	8,15 (7,97-8,33)	11,34 (3,77-18,90)	30,55 (6,19-54,90)	7,71 (5,57-9,85)	7,14 (4,18-10,09)
ASMase	8,83 (7,97-9,68)	9,63 (8,93-10,33)	11,16 (6,63-15,69)	31,37 (13,18-49,56)	8,16 (7,74-8,58)	7,31 (4,38-10,24)



Активность лизосомных ферментов в первичной культуре макрофагов периферической крови пациентов с ГБА-БП при культивировании в присутствии ингибитора MLI-2 в различной концентрации.

Lysosomal enzymes activity in the primary culture of peripheral blood macrophages of patients with GBA-PD in the presence of various concentrations of the MLI-2 inhibitor.

исследования на расширенных выборках пациентов для подтверждения выявленного эффекта действия ингибитора киназной активности LRRK2 MLI-2 на активность лизосомных ферментов.

Литература/References

1. Tolosa E., Vila M., Klein C., Rascol O. LRRK2 in Parkinson disease: challenges of clinical trials. *Nat Rev Neurol.* 2020;16(2): 97-107.
2. Emelyanov A.K., Usenko T.S., Tesson C., Senkevich K.A., Nikolaev M.A., Miliukhina I.M., Kopytova A.E., Timofeeva A.A., Yakimovskiy A.F., Lesage S., Brice A., Pchelina S. Analysis of genetic variability in Parkinson's disease in Russia. *Neurobiology of aging.* 2018;71: 267.e7-267.e10.
3. Siebert M., Sidransky E., Westbroek W. Glucocerebrosidase is shaking up the synucleinopathies. *Brain.* 2014;137(Pt 5):1304-1322.
4. Riboldi G.M., Di Fonzo A.B. GBA, Gaucher Disease, and Parkinson's Disease: From Genetic to Clinic to New Therapeutic Approaches. *Cells.* 2019;8(4):364.
5. Schneider S.A., Alcalay R.N. Precision medicine in Parkinson's disease: emerging treatments for genetic Parkinson's disease. *J Neurol.* 2020;267:860-869.
6. Ysselstein D., Nguyen M., Young T.J., Severino A., Schwake M., Merchant K., Krainc D. LRRK2 kinase activity regulates lysosomal glucocerebrosidase in neurons derived from Parkinson's disease patients. *Nat Commun.* 2019;10(1):5570.
7. 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..
8. Eguchi T., Kuwahara T., Sakurai M., Komori T, Fujimoto T., Ito G., Yoshimura S.I., Harada A., Fukuda M., Koike M., Iwatsubo T. LRRK2 and its substrate Rab GTPases are sequentially targeted onto stressed lysosomes and maintain their homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(39):E9115-E9124.