

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-302

**MTOR-ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ *GBA1*\*****MTOR-A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET FOR PARKINSON'S DISEASE WITH MUTATIONS IN THE *GBA1* GENE**А. И. Безрукова<sup>1,2</sup>, К. С. Башарова<sup>1</sup>, М. М. Руденок<sup>3</sup>, Г. В. Байдакова<sup>4</sup>, И. В. Милюхина<sup>1,5</sup>,  
Е. Ю. Захарова<sup>4</sup>, П. А. Сломинский<sup>3</sup>, С. Н. Пчелина<sup>1,2</sup>, Т. С. Усенко<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики

им. Б. П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина

<sup>2</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова<sup>3</sup>Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва<sup>4</sup>Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова, Москва<sup>5</sup>Институт мозга человека им. Н. П. Бехтеревой РАН, Санкт-ПетербургA. I. Bezrukova<sup>1,2</sup>, K. S. Basharova<sup>1</sup>, M. M. Rudenok<sup>3</sup>, G. V. Baydakova<sup>4</sup>, I. V. Miliukhina<sup>1,5</sup>,  
E. Y. Zakharova<sup>4</sup>, P. A. Slominsky<sup>3</sup>, S. N. Pchelina<sup>1,2</sup>, T. S. Usenko<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Petersburg Nuclear Physics Institute named after B. P. Konstantinov  
of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina<sup>2</sup>Pavlov First Saint Petersburg State Medical University<sup>3</sup>Institute of Molecular Genetics of National Research Centre "Kurchatov Institute", Moscow<sup>4</sup>Research Center for Medical Genetics, Moscow<sup>5</sup>Institute of Human Brain RAS, Saint Petersburg

✉ bz.nastya96@gmail.com

**Аннотация**

Молекулярные механизмы нейродегенеративного заболевания болезни Паркинсона (БП), ассоциированной с мутациями в гене *GBA1*, кодирующем фермент глюкоцереброзидазу (GCase) (*GBA1*-БП), не известны. Анализ транскриптомов клеточной и животной моделей с индукцией паркинсонизма с дисфункцией GCase с последующей валидацией показал нарушение mTOR-зависимой аутофагии. Также была оценена потенциальная терапевтическая значимость mTOR для терапии *GBA1*-БП.

**Abstract**

The molecular mechanisms of the neurodegenerative disorder Parkinson's disease (PD) associated with mutations in the *GBA1* gene which encodes the lysosomal enzyme glucocerebrosidase (GCase) gene, (*GBA1*-PD) are unknown. Transcriptome analysis of cellular and animal models with induced parkinsonism and GCase dysfunction, followed by subsequent validation, showed impairment of mTOR-dependent autophagy. The potential therapeutic significance of mTOR for the treatment of *GBA1*-PD was also assessed.

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное нейродегенеративное заболевание, в основе патогенеза которого лежит накопление белка альфа-синуклеина в черной субстанции (ЧС) головного мозга. БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1* (*GBA1*-БП), кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), является наиболее распространенной формой БП с известной этиологией. Молекулярные механизмы *GBA1*-БП не известны, и, как следствие, нейропротекторной терапии не существует.

**Цель данной работы** заключалась в поиске потенциальных терапевтических мишеней и биомаркеров *GBA1*-БП в ходе сопоставления транскриптомов клеточных и животных моделей паркинсонизма с дисфункцией GCase с последующей валидацией полученных данных и апробацией терапевтической мишени на клеточных моделях.

Полнотранскриптомный анализ проводился в клетках ЧС 4 мышей с индукцией паркинсонизма с дисфункцией GCase посредством сочетанного введения 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МРТР) и конду-

\* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 24-25-00212).

ритол- $\beta$ -эпоксида (СВЕ) (МРТР+СВЕ), 4 мышей с индукцией паркинсонизма (МРТР), 4 мышей с дисфункцией GCase (СВЕ) и 4 мышей с инъекцией NaCl (контроль), а также в первичной культуре макрофагов периферической крови (ПКМПК) 5 пациентов с GBA1-БП, 4 бессимптомных носителей мутаций в гене GBA1 (GBA1-носителей) и 5 неврологически здоровых индивидуумов (контроль).

Валидация выявленных дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГов) проводилась методом количественной ПЦР в режиме реального времени, и оценка значимости выявленных метаболических путей проводилась на уровне мРНК и белка методами количественной ПЦР в режиме реального времени, и вестерн-блот, соответственно, в мононуклеарах периферической крови 15 пациентов с GBA1-БП, 15 GBA1-носителей, 40 пациентов со спорадической формой БП (сБП) и 50 контроля. Апробация предложенной потенциальной мишени проводилась путем оценки биохимических параметров клетки, ассоциированных с БП, методом ВЭЖХ-МС/МС, иммунофлуоресценции и вестерн-блот путем аппликации селективного препарата к выявленной мишени на ПКМПК контрольной группы и на клеточной линии нейробластомы SH-SY5Y.

В ходе анализа транскриптома ЧС головного мозга мышей с МРТР+СВЕ, МРТР, СВЕ и контроля, а также ПКМПК пациентов с GBA1-БП, GBA1-носителей и контроля были получены списки ДЭГов и метаболических путей. Интересно отметить, что продукты генов с наиболее значимым изменением экспрессии, выявленные в ЧС головного мозга мышей с МРТР+СВЕ по сравнению со всеми исследуемыми группами (*Arl4d*, *Sgk1*, *Ddit4*, *Pdk4*) и в ПКМПК пациентов с GBA1-БП по сравнению с GBA1-носителями и контролем (*ARL4C*, *DUSP1*, *BCL6*, *TRIM13*, *EGR1*, *NR4A2*, *IL6*), регулируются PI3K/АКТ/mTOR. В ходе валидации выявленных генов в мононуклеарах периферической крови пациентов с GBA1-БП было показано снижение экспрессии генов *ARL4C*, *DUSP1*, *ARL4D*, *IL6* по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) и снижение экспрессии генов *ARL4C*, *DUSP1*, *NR4A2*, *DDIT4* ( $p < 0,05$ ) по сравнению с GBA1-носителями, что подтверждает результаты анализа транскриптомов. Ввиду многофункциональности пути PI3K/АКТ/mTOR в клетке был оценен уровень мРНК (*mTOR*, *BECN1*, *SQSTM1*, *MAP1LC3B*, *CTSD*) и уровень ключевых белков процесса mTOR-зависимой аутофагии (p-mTOR (Ser2448), beclin-1, p62, LC3B-II, зрелая форма cathepsin D). Посредством аутофагии деградирует около половины альфа-синуклеина. Показано увеличение экспрессии гена *mTOR* у пациентов с GBA1-БП по сравнению с GBA1-носителями, контролем ( $p < 0,05$ ), а также гена *MAP1LC3B* по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) на фоне снижения зрелой формы cathepsin D у пациентов с GBA1-БП, сБП и GBA1-носителей по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ). Носители мутаций в гене GBA1 независимо от статуса БП отличались повышенным уровнем белка beclin-1 по сравнению с пациентами со сБП и контролем ( $p < 0,05$ ). Выявлено нарушение процесса аутофагии у носителей мутаций в гене *GBA1* как с установленным диагнозом БП, так и без него.

В ходе апробации выявленной потенциальной терапевтической мишени mTOR на ПКМПК и клеточной линии SH-SY5Y при обработке ингибитором активности mTOR Торином 1 показано увеличение степени колокализации LC3B с лизосомой и увеличение белка GCase без изменения активности GCase и ее субстрата. Показано снижение токсичной фосфорилированной формы белка альфа-синуклеина (Ser129) наряду с увеличением его стабильной тетрамерной формы при обработке клеточной линии SH-SY5Y Торином 1.

Таким образом, GBA1-БП характеризуется нарушением mTOR-зависимой аутофагии. Воздействие на активность mTOR может рассматриваться в качестве потенциальной терапевтической стратегии для терапии GBA1-БП.