

Поиск мишеней для терапии болезни Паркинсона на основе анализа транскриптома черной субстанции модельных животных мышей с МФТП-индуцированным паркинсонизмом и дисфункцией глюкоцереброзидазы

Усенко Т.С.^{1*}, Безрукова А.И.^{1, 2}, Башарова К.С.¹, Руденок М.М.³,
Шадрина М.И.³, Сломинский П.А.³, Пчелина С.Н.^{1, 2}

¹ *Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия*

² *Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

³ *Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия*

* usenko_ts@pnpi.nrcki.ru

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; терапия; модельные животные; транскриптом

Мотивация и цель: Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции (ЧС) головного мозга [1]. Мутации в гене *GBA1*, кодирующем лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), являются самым распространенным фактором генетического риска БП. БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1* (*GBA1*-БП), является наиболее распространенной формой заболевания с известной этиологией [2, 3]. Цель данной работы заключалась в поиске потенциальных биомаркеров и терапевтических мишеней БП при дисфункции GCase на основе анализа транскриптома ЧС модельных животных.

Методы и алгоритмы: В ходе данной работы были сформированы 4 группы мышей самцов линии C57BL/6 по 4 животных в каждой группе со следующими инъекциями: 0.9 % раствора NaCl (контроль), нейротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МРТР) для индукции паркинсонизма, растворенный в 0.9 % физиологическом растворе и введенный подкожно в дозе 12 мг/кг дважды с интервалом 2 часа, селективный ковалентный ингибитор GCase кондуритол-β-эпоксид (СВЕ) для дисфункции GCase, растворенный в 0.9 % физиологическом растворе и введенный внутривентрикулярно разово в концентрации 100 мг/кг и одновременным введением СВЕ и МРТР (СВЕ/МРТР) в концентрациях, описанных выше для индукции паркинсонизма с дисфункцией GCase. В результате РНК-секвенирования дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) в ЧС модельных животных определяли с помощью пакета DESeq2 (v3.12) по следующим критериям: кратность изменения экспрессии $|\text{Fold Change}| < 1.5$ и $p\text{-value} < 0.01$ в среде R с использованием встроенного пакета DESeq2. Оценка экспрессии генов проводилась методом количественной ПЦР в режиме реального времени в мононуклеарах периферической крови, выделенных методом градиентного центрифугирования на градиенте фиколла, 14 пациентов с *GBA1*-БП, 30 пациентов с БП, 15 неврологически здоровых бессимптомных носителей мутаций в гене *GBA1* и 45 индивидуумов контрольной группы.

Результаты: Анализ дифференциальной экспрессии генов в клетках ЧС головного мозга мышей выявил 64 ДЭГ в группе МРТР, 2 ДЭГ в группе СВЕ, 37 ДЭГ в группе МРТР/СВЕ по сравнению с контролем, а также 23 ДЭГ в группе МРТР по сравнению с СВЕ, 23 ДЭГ МРТР/СВЕ по сравнению с СВЕ, 20 ДЭГ в группе МРТР/СВЕ по сравнению с МРТР. С помощью базы Gene Ontology было показано, что выявленные в группе МРТР/СВЕ по сравнению с МРТР и контролем ДЭГ вовлечены в такие биологические процессы, как нейрогенез, везикулярный транспорт и аутофагия, посредством которой деградирует белок альфа-синуклеин. Интересно отметить, что продукты генов с наиболее значимым изменением уровня экспрессии в группе МРТР/СВЕ по сравнению с группой СВЕ и контролем вовлечены в сигнальный путь PI3K/АКТ/mTOR, являющийся ключевым звеном регуляции аутофагии. На основе результатов анализа транскриптома была оценена экспрессия генов, вовлеченных в PI3K/АКТ/mTOR, а именно генов, вовлеченных в mTOR-зависимую аутофагию (*mTOR*, *MAP1LC3B*, *BECN1*, *SQSTM1*, *CTSD*). Показано увеличение экспрессии гена *MAP1LC3B* у пациентов с GBA1-БП и GBA1-носителей по сравнению с пациентами с сБП ($p < 0.05$), а также увеличение экспрессии гена *MAP1LC3B* у пациентов с GBA1-БП по сравнению с контролем ($p < 0.01$). Уровень экспрессии гена *mTOR* был повышен у пациентов с GBA1-БП и сБП по сравнению с GBA1-носителями и контролем ($p < 0.05$). Также было выявлено снижение экспрессии гена *SQSTM1* у пациентов с GBA1-БП по сравнению с пациентами с сБП ($p < 0.05$).

Выводы: Наши результаты позволяют предположить, что БП с дисфункцией GCase характеризуется выраженным нарушением пути PI3K/АКТ/mTOR. Данный путь может рассматриваться как потенциальная терапевтическая мишень для БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1*.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (№ 24-15-00177).

Targets for therapy of Parkinson's disease based on transcriptome analysis of the substance nigra of a mouse model with MPTP-induced parkinsonism and glucocerebrosidase dysfunction

Usenko T.S.^{1, 2*}, Bezrukova A.I.^{1, 2}, Basharova K.S.^{1, 2}, Rudenok M.I.³, Shadrina M.I.³, Slominsky P.A.³, Pchelina S.N.^{1, 2}

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Center "Kurchatov Institute", Gatchina, Russia

² Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russia

³ Institute of Molecular Genetics of National Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

* usenko_ts@npni.nrcki.ru

Key words: Parkinson's disease; therapy; model animals; transcriptome

Motivation and Aim: Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disease characterized by death of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) of the brain [1]. Mutations in the *GBA1* gene, which encodes the lysosomal enzyme

glucocerebrosidase (GCase), are the most common genetic risk factor for PD. PD associated with mutations in the *GBA1* gene (GBA1-PD) is one of the most common form of disease with a widespread etiology [2, 3]. The goal of the work was to search for biomarkers and therapeutic targets for PD with GCase dysfunction based on transcriptome analysis of SN of animal models.

Methods and Algorithms: In the current study, 4 groups of male mice of the C57BL/6 line were formed, 4 animals in each group, following injections: 0.9 % NaCl solution (control), neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) for induction of parkinsonism, dissolved in a 0.9 % serial solution and administered subcutaneously at a dose of 12 mg/kg multiple times at 2 intervals, the selective covalent GCase inhibitor conduritol- β -epoxide (CBE) for GCase dysfunctions, dissolved in a 0.9 % serial solution and administered intraperitoneally in a single dose institutions 100 mg/kg and simultaneous administration of CBE and MPTP (CBE/MPTP) at the concentrations described above to induce parkinsonism with GCase dysfunction. Whole-transcriptome analysis is carried out in SN cells of the mouse brain. Differentially expressed genes (DEGs) are performed using the DESeq2 package (v3.12) according to the following criteria: fold change in expression $|\text{Fold Change}| < 1.5$ and $p\text{-value} < 0.01$ in R using DESeq2 package. Gene expression was assessed by quantitative real-time PCR in peripheral blood mononuclear cells isolated by Ficoll gradient centrifugation from 14 patients with GBA1-PD, 30 patients with PD, 15 neurologically healthy asymptomatic carriers of mutations in the *GBA1* gene (GBA1-carriers) and 45 individuals in the control group.

Results: Analysis of differential gene expression in SN cells of the mouse brain revealed 64 DEGs in the MPTP group, 2 DEGs in the CBE group, 37 DEGs in the MPTP/CBE group compared with the control, as well as 23 DEGs in the MPTP group compared with CBE, 23 MPTP DEGs /CBE vs. CBE, 20 DEGs in MPTP/CBE vs. MPTP group. Using the Gene Ontology database, it was shown that the DEGs identified in the MPTP/CBE group compared to MPTP and control are involved in biological processes such as neurogenesis, vesicular transport and autophagy, through which the protein alpha-synuclein is degraded. It is interesting to note that the gene products with the most significant changes in expression levels in MPTP/CBE group compared to CBE group and control are involved in PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, which is a key link in the regulation of autophagy. Based on the results of our transcriptome analysis, the expression level of genes involved in PI3K/AKT/mTOR, namely genes involved in mTOR-dependent autophagy (*mTOR*, *MAP1LC3B*, *BECN1*, *SQSTM1*, *CTSD*), was assessed. An increase in the *MAP1LC3B* gene expression was shown in patients with GBA1-PD and GBA1-carriers compared to patients with PD ($p < 0.05$), as well as an increase in the *MAP1LC3B* gene expression in patients with GBA1-PD compared to controls ($p < 0.01$). The level of mTOR gene expression was increased in patients with GBA1-PD and PD compared to GBA1-carriers and controls ($p < 0.05$). A decrease in the *SQSTM1* gene expression was also found in patients with GBA1-PD compared to patients with PD ($p < 0.05$).

Conclusions: Thus, it can be assumed that PD with GCase dysfunction is characterized by disruption of the PI3K/AKT/mTOR pathway. This pathway can be considered as a potential therapeutic target for PD, associated with mutations in the *GBA1* gene.

Funding: The study is supported Russian Science Foundation (No. 24-15-00177).

Список литературы/References

1. Lill C.M. Genetics of Parkinson's disease. *Mol Cell Probes*. 2016;30(6):386-396. doi 10.1016/j.mcp.2016.11.001
2. Neumann J., Bras J., Deas E. et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain*. 2009;132(Pt. 7):1783-1794. doi 10.1093/brain/awp044
3. Emelyanov A.K., Usenko T.S., Tesson C., Senkevich K.A.. et al. Mutation analysis of Parkinson's disease genes in a Russian data set. *Neurobiol Aging*. 2018;71:267.e7-267.e10. doi 10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.027