

УДК 576.4

Мутации в гене *PARK2*, ассоциированном с болезнью Паркинсона, сопровождаются разбалансировкой систем программируемой клеточной гибели

Е. В. Коновалова¹, О. М. Лопачева^{1,2}, И. А. Гривенников³, О. С. Лебедева³,
Э. Б. Дашинимаев⁴, Л. Г. Хаспеков¹, Е. Ю. Федотова¹, С. Н. Иллариошкин^{1*}

¹Научный центр неврологии, 125367, Москва, Волоколамское ш., 80

²Международный учебно-научный биотехнологический центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/12

³Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 2

⁴Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

*E-mail: snillario@gmail.com

Поступило в редакцию 04.06.2015

РЕФЕРАТ Болезнь Паркинсона обусловлена дегенерацией дофаминергических нейронов среднего мозга. Причиной редкой рецессивной формы этого заболевания могут быть мутации гена *PARK2*, продукт которого, паркин, контролирует процессы митофагии и программируемой клеточной гибели. Определен уровень про- и антиапоптотических факторов семейства Bcl-2 в дофаминергических нейронах, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток здорового донора и пациента с болезнью Паркинсона – носителя мутаций *PARK2*. Методом Вестерн-блоттинга проанализированы соотношения белков Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-XL и Bcl-W. Показано, что уровень проапоптотического белка Bax в *PARK2*-нейронах вдвое ниже по сравнению со здоровыми клетками. Напротив, экспрессия антиапоптотических факторов Bcl-XL, Bcl-W и Bcl-2 статистически значимо увеличена в мутантных клетках по сравнению со здоровыми дофаминергическими нейронами. Полученные результаты показывают, что мутации *PARK2* сопровождаются разбалансировкой систем программируемой клеточной гибели, в которой ведущая роль принадлежит неапоптотическим молекулярным механизмам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Паркинсона, дофаминергические нейроны, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, *PARK2*, мутации, программируемая клеточная гибель.

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание, обусловленное поражением пигментированных нейронов компактной части черной субстанции среднего мозга и дегенерацией дофаминергического nigrostriatalного пути. Лечение при БП носит лишь симптоматический характер и не предотвращает дальнейшей гибели nigralных клеток, что диктует необходимость идентификации ключевых звеньев патогенетического каскада болезни [1].

В развитии БП важная роль принадлежит генетике. Примерно 10% всех случаев БП представлены моногенными формами [1, 2], а остальные (спорадические) случаи имеют многофакторную природу. На сегодняшний день известно 20 генетических локусов БП [2]. Один из вовлекаемых генов, *PARK2*,

расположен на хромосоме 6q25.2-27 и связан с развитием особой формы болезни – аутосомно-рецессивной БП, манифестирующей в раннем возрасте [3]. Мутации *PARK2* обуславливают около 15% семейных и 4% спорадических случаев БП с дебютом до 40 лет [3–5]. Ген *PARK2* кодирует белок паркин – цитозольную убиквитин-Е3-лигазу. Основная роль паркина состоит в регуляции митофагии, осуществляемой вместе с митохондриальным белком PINK1 – продуктом еще одного гена аутосомно-рецессивного паркинсонизма [6]. Последовательность молекулярных событий выглядит следующим образом: нефункциональная митохондрия деполяризуется и тем самым стабилизирует PINK1, после чего тот захватывает паркин из цитозоля и активирует его при доставке к митохондрии за счет PINK1-киназой

активности; далее активированный паркин обеспечивает селективную аутофагию поврежденной органеллы [7].

Таким образом, взаимодействуя друг с другом, паркин и PINK1 осуществляют контроль состояния митохондрий. В настоящее время паркин рассматривается в качестве поливалентного нейропротекторного агента, имеющего ключевое значение для выживания дофаминергических нейронов при воздействии различных нейротоксинов [8].

Изучение клеточной биологии и нейрохимии PARK2/паркина является чрезвычайно актуальным направлением современной неврологии. Объектом наших исследований стал мутантный паркин, экспрессируемый в клетках пациента с редкой PARK2-ассоциированной формой БП. В качестве модельной системы была выбрана культура обогащенных дофаминергическими нейронами нервных клеток, полученных в результате репрограммирования фибробластов кожи в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) и их последующей направленной дифференцировки [9, 10]. С целью уточнения патогенеза болезни мы изучали динамику ряда про- и антиапоптотических факторов в мутантной культуре в сопоставлении с культурой нейронов, полученных от здорового донора.

В работе использовали культуры клеток здорового донора и пациента с аутосомно-рецессивной ювенильной БП, носителя компунд-гетерозиготных мутаций в гене PARK2 (del202-203AG и IVS1+1G/A). Из биоптатов кожи донора и пациента ранее нами были получены фибробласты, которые репрограммировали при помощи оригинальных лентивирусных векторов с факторами плюрипотентности (LeGO-hOCT4, LeGO-hSOX2-IRES-GFP, LeGO-hc-Myc, LeGO-hKLF4) с целью получения клонов ИПСК. Далее клетки были дифференцированы по нейрональному типу с использованием факторов дифференцировки. Методики получения фибробластов и их репрограммирования, а также индукции дифференцировки ИПСК в специализированные дофаминергические нейроны описаны ранее [10].

Дифференцировку клеток в нейроны подтверждали с помощью иммуноцитохимического окрашивания антителами к β -III-тубулину и тирозингидроксилазе (ТН). Вестерн-блоттинг для определения содержания белков в клеточных культурах проводили по стандартной методике.

Результаты обрабатывали в программах Microsoft Excel и GraphPad Prism 6.

Клеточные линии Po2 и Tr5 при дифференцировке экспрессировали нейрональные маркеры, которые выявляли при помощи иммуноцитохимического окрашивания (рис. 1). Белок β -III-тубулин является

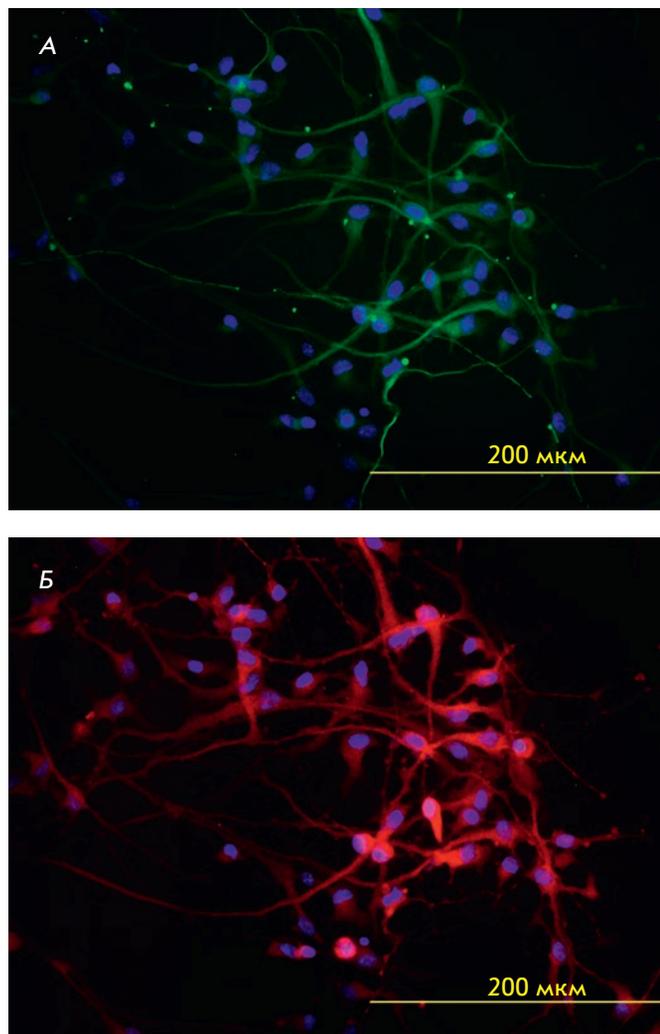


Рис. 1. Иммуноцитохимическое окрашивание нейронов, дифференцируемых из ИПСК. А – окраска на β -III-тубулин (зеленый цвет); Б – окраска на ТН (красный цвет); синим цветом обозначены ядра клеток (маркер DAPI)

классическим маркером ранней нейрональной дифференцировки, а ТН традиционно рассматривается как специфический маркер дифференцировки нейронов по дофаминергическому пути. Как видно из рис. 1, дифференцировке подвергаются все ИПСК, поскольку все ядра клеток, окрашенные DAPI, находятся в нейронах (позитивных по β -III-тубулину и ТН). Количество нейронов, дифференцированных по дофаминергическому пути, составляет около 80% от общего количества клеток, позитивных по β -III-тубулину.

Оказалось, что соотношение про- и антиапоптотических факторов в клеточных культурах Po2 и Tr5, полученных соответственно от здорового до-

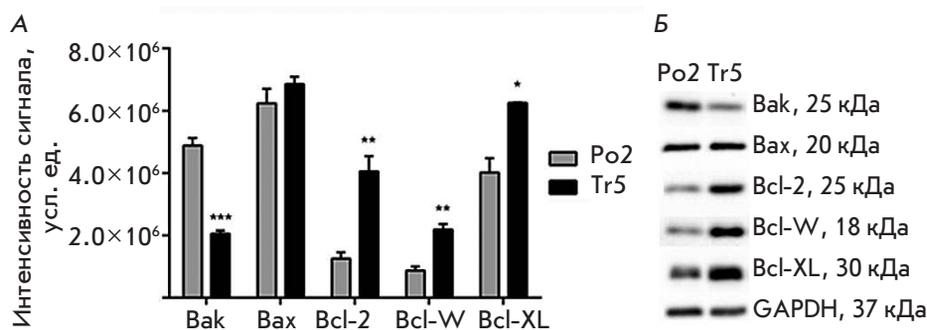


Рис. 2. Количественный анализ про- и антиапоптотических белков в клеточной культуре Po2, полученной от здорового донора, и в культуре Tr5, полученной от пациента с БП – носителя мутаций в гене *PARK2* (Вестерн-блоттинг). А – интенсивность сигнала (в условных единицах) от полос Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-W и Bcl-XL ($n = 3$). $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) и $p < 0.05$ (*) при сравнении культур Po2 и Tr5. Б – репрезентативные фотографии полос, полученных при проведении Вестерн-блоттинга

нора и носителя мутаций в гене *PARK2*, различается (рис. 2).

Концентрация проапоптотического белка Bak в мутантных дофаминергических нейронах Tr5 была статистически значимо ниже (на 58%), чем в клетках здорового донора в культуре Po2 ($p < 0.001$). Значимых различий в содержании проапоптотического белка Bax в изучаемых культурах клеток не обнаружено.

Содержание антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-W и Bcl-XL оказалось статистически значимо более высоким в клетках Tr5, экспрессирующих мутантный *PARK2*. Так, концентрация белка Bcl-2 в мутантных клетках была на 222% выше, чем в клетках дикого типа, белка Bcl-W – на 150.5% (в обоих случаях $p < 0.01$), а белка Bcl-XL – на 55% ($p < 0.05$).

Каждая проба содержала 20 мкг общего белка. Равномерность нанесения белка на гель дополнительно контролировали с использованием белка GAPDH, уровень сигнала которого во всех образцах был одинаковым (рис. 2Б).

Описано несколько вариантов программируемой клеточной гибели при БП и других нейродегенеративных заболеваниях – классический апоптоз, аутофагический путь, AIF/PARP-зависимый путь, паратоз и др. [11, 12]. В ряде случаев, однако, закономерности клеточной гибели не соответствуют какому-то одному механизму и имеют комплексный характер. Важную роль в клеточной гибели играет высвобождение из митохондрий цитохрома с [13]. Цитохром с активирует цитозольный белок Araf-1 и прокаспазу-9 по пути формирования апоптосомы, и его выброс строго регулируется соотношением в клетке про- и антиапоптотических факторов. Дисбаланс в данной системе, выявленный нами в *PARK2*-скомпромитированных нейронах, может быть связан с функциональными свойствами дефектного паркина, но это предположение нуждается в до-

полнительном подтверждении на культурах с нормальным и мутантным генотипами.

Белок паркин действует как митохондриальный нейропротектор. Установлено, в частности, специфическое автономное влияние паркина на митохондриальные механизмы, определяющие высвобождение цитохрома с и запуск реакций апоптоза [14]. Недавно идентифицирован паркиноподобный цитоплазматический белок, ассоциированный с p53 (PARC): как и паркин, он является E3-лигазой и инициирует протеасомную деградацию цитохрома с [15]. Важным этапом защитного действия паркина может быть протеасомная деградация ARTS – митохондриального белка, инициирующего ранний (до выделения цитохрома с) этап каспазного пути [16]. Тем не менее детальные молекулярные механизмы нейропротекции, ассоциированные с паркином, остаются не до конца ясными.

Особенность культуры Tr5 состоит в отсутствии нормального паркина, поскольку нейроны данной культуры несут две инактивирующие рецессивные мутации гена *PARK2* (делецию со сдвигом рамки del202-203AG и мутацию сплайсинга IVS1+1G/A). Таким образом, в мутантной культуре нарушен селективный процессинг митохондриальных белков и цитохрома с, осуществляемый паркином. При этом в культуре Tr5 вместо ожидаемой инициации апоптоза нами выявлено статистически значимое снижение концентрации проапоптотического белка Bak и, напротив, повышение уровня всех исследованных антиапоптотических белков семейства Bcl. Полученные результаты сходны с данными о повышении уровня Bcl-XL *in vivo* и *in vitro* в модели индуцированного паракватом паркинсонизма [17]. Одной из функций паркина считается предотвращение транслокации апоптотического белка Bax в митохондрии [18], однако нарушение регуляции этого процесса в *PARK2*-мутантных клетках не затраги-

вает экспрессию Вах и может не сопровождаться изменением его уровня в культуре. В последние годы большое значение в митохондриальном цитотоксическом каскаде при БП придается микроглиальной активации и воспалению [19], причем эти процессы не требуют индукции митохондриального апоптоза [20], что косвенно подтверждается и нашими данными.

ВЫВОДЫ

1. Нами представлены характеристики системы Вах/Вак/Vcl при аутосомно-рецессивном паркинсонизме со сложной мутацией *PARK2*: установлено, что мутации *PARK2* приводят к сложной разбалансировке

систем программируемой клеточной гибели, ведущая роль в которой принадлежит, по-видимому, неапоптотическим молекулярным механизмам.

2. Полученные предварительные данные должны быть подтверждены на дофаминергических нейронах, полученных от других гомозиготных и гетерозиготных носителей мутаций гена *PARK2*.

3. Результаты нашей работы показывают, что разрабатываемые подходы к терапии нейродегенеративных заболеваний, связанные с подавлением апоптоза [11, 12], могут оказаться неэффективными при *PARK2*-ассоциированной БП. ●

Работа поддержана РФФ (грант № 14-15-01047).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jenner P., Morris H.R., Robbins T.W., Goedert M., Hardy J., Ben-Shlomo Y., Bolam P., Burn D., Hindle J.V., Brooks D. // *J. Parkinson's Dis.* 2013. V. 3. P. 1–11.
- Bonifati V. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2014. V. 20 (Suppl. 1). P. S23–S28.
- Загоровская Т.Б., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д., Лимборская С.А., Левин О.С., Милосердова О.В., Просокова Т.Н., Багыева Г.Х., Брис А. // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2004. Т. 8. С. 66–72.
- Periquet M., Lücking C.B., Vaughan J.R., Bonifati V., Dürr A., De Michele G., Horstink M.W., Farrer M., Illarioshkin S.N., Polak P., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 68. P. 617–626.
- Kilariski L.L., Pearson J.P., Newsway V., Majounie E., Knipe M.D., Misbahuddin A., Chinnery P.F., Burn D.J., Clarke C.E., Marion M.H., et al. // *Mov. Disord.* 2012. V. 27. P. 1522–1529.
- Park J., Lee S.B., Lee S., Kim Y., Song S., Kim S., Bae E., Kim J., Shong M., Kim J.M., Chung J. // *Nature.* 2006. V. 441. P. 1157–1161.
- Matsuda N., Sato S., Shiba K., Okatsu K., Saisho K., Gautier C.A., Sou Y.S., Saiki S., Kawajiri S., Sato F., et al. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 189. P. 211–221.
- Lim K.L., Ng X.H., Grace L.G., Yao T.P. // *Antioxid. Redox. Signal.* 2012. V. 16. P. 935–949.
- Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell.* 2006. V. 126. P. 663–676.
- Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Киселев С.Л., Мухина И.В., Ведунова М.В., Усова О.В., Ставровская А.В., Ямщикова Н.Г., Федотова Е.Ю., Гривенников И.А. и др. // *Нейрохимия.* 2013. V. 3. P. 233–241.
- Esposito E., Cuzzocrea S. // *Curr. Med. Chem.* 2010. V. 17. P. 2764–2774.
- Lockshin R.A., Zakerib Z. // *J. Cell Mol. Med.* 2007. V. 11. P. 1214–1224.
- Kim J., Yang Y., Song S.S., Na J.H., Oh K.J., Jeong C., Yu Y.G., Shin Y.K. // *Biophys. J.* 2014. V. 107. P. 1601–1608.
- Berger A.K., Cortese G.P., Amodeo K.D., Weihofen A., Letai A., LaVoie M.J. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. P. 4317–4328.
- Gama V., Swahari V., Schafer J., Kole A.J., Evans A., Huang Y., Cliffe A., Golitz B., Sciaky N., Pei X.H., et al. // *Sci. Signal.* 2014. V. 7(334). P. ra67. doi: 10.1126/scisignal.2005309.
- Kemeny S., Dery D., Loboda Y., Rovner M., Lev T., Zuri D., Finberg J.P., Larisch S. // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e38837.
- Fei Q., McCormack A.L., Di Monte D.A., Ethell D.W. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 3357–3364.
- Charan R.A., Johnson B.N., Zaganelli S., Nardozi J.D., LaVoie M.J. // *Cell Death Dis.* 2014. V. 5. P. e1313. doi:10.1038/cddis.2014.278.
- Yan J., Fu Q., Cheng L., Zhai M., Wu W., Huang L., Du G. // *Mol. Med. Rep.* 2014. V. 10. P. 2223–2233.
- Allam R., Lawlor K.E., Yu E.C., Mildenhall A.L., Moujalled D.M., Lewis R.S., Ke F., Mason K.D., White M.J., Stacey K.J., et al. // *EMBO Rep.* 2014. V. 15. P. 982–990.