

АПОПТОЗ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С LRRK2-АССОЦИИРОВАННОЙ ФОРМОЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© Т. С. Усенко,^{1,2} А. К. Емельянов,^{1,2} А. Ф. Якимовский,² Н. А. Боганькова,³
Т. В. Вавилова,³ А. Л. Шварцман,¹ С. Н. Пчелина^{1, 2, *}

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН,
² С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
и ³ С.-Петербургская государственная медицинская академия им. И. И. Мечникова;
* электронный адрес: sopchelina@hotmail.com

Мутации в гене обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (*LRRK2*) — наиболее частая причина развития семейных форм болезни Паркинсона (БП). Механизм патогенеза *LRRK2*-ассоциированной БП остается неизвестным, при этом обсуждается участие *LRRK2* в генерации программируемой клеточной гибели (апоптоза). У пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП по сравнению с контрольной группой мы наблюдали методом проточной цитометрии повышенный уровень спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови в культуре через 24 ($P < 0.016$) и 48 ($P < 0.031$) ч. Кроме того, у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП выявлено увеличение уровня мРНК гена *FAS* по сравнению как с контрольной группой ($P < 0.05$), так и с группой пациентов со спорадической БП ($P < 0.002$). Достоверные различия в уровне экспрессии гена *FAS* сохранялись спустя 3 года ($P < 0.03$) и наблюдались также через 24 ч ($P < 0.05$) культивирования лимфоцитов у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП по сравнению с контрольной группой. Повышенный уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов наряду с увеличением уровня мРНК *FAS* дает основание сделать предположение о предпочтительной активации внешнего пути апоптоза при наличии мутации в гене *LRRK2*.

Ключевые слова: апоптоз, болезнь Паркинсона, лимфоциты, *BCL-2*, *FAS*, *LRRK2*.

Болезнь Паркинсона (БП) — широко распространенное нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется прогрессивной потерей дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга человека. В настоящее время механизм нейродегенерации остается неизвестным.

Нарушение регуляции апоптоза дофаминергических нейронов черной субстанции рассматривают как один из возможных механизмов их гибели при БП. Так, признаки апоптоза обнаружены в исследованиях биоптата головного мозга у пациентов с БП и в экспериментах, выполненных на модельных животных (Tatton, 2000; Fukae et al., 2003; Yamada et al., 2010). Следует, однако, отметить, что не у всех пациентов с БП в биопсийном материале мозга обнаружены морфологические признаки апоптоза (Moos, Jensen, 2004). Таким образом, вопрос о механизме гибели нейронов черной субстанции при БП остается открытым. В частности, не исключается возможность участия факторов воспаления и аутофагии в патогенезе БП (Mizushima et al., 2008; Levy et al., 2009).

Исследование моногенных форм заболевания с известной этиологией является важным подходом для изучения молекулярных основ патогенеза БП. Мутации в гене *LRRK2* являются наиболее частой причиной развития семейных форм БП (Paisan-Ruiz et al., 2004). Самой распространенной мутацией среди пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП является мутация G2019S, ассоциированная с повышением активности киназной активности *LRRK2*

(West et al., 2005; Smith et al., 2006). Ранее мы описали шесть семей, где БП обусловлена наличием мутации G2019S, причем в одной семье выявлена новая мутация V1613A (Pchelina et al., 2006, 2008).

Физиологическая роль *LRRK2* неясна. Недавние исследования, выполненные на нейрональных клеточных линиях, позволяют предположить, что мутации в гене *LRRK2* вызывают программируемую клеточную гибель (апоптоз) нейронов (Iaccarino et al., 2007; Ho et al., 2009).

Настоящая работа посвящена исследованию уровней экспрессии мРНК генов *FAS* и *BCL-2* и апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП.

Материал и методика

Группа пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП (5 пациентов с мутацией G2019S и 1 — с мутацией V1613A) описана нами ранее (Pchelina et al., 2008). Клинические характеристики пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП представлены в табл. 1. Группа пациентов со спорадической формой БП (сБП) (без мутаций в гене *LRRK2*) состояла из 12 человек (средний возраст 65 ± 8 лет, 8 мужчин и 4 женщины). В исследование вошли две контрольные группы: контрольная группа 1 состояла из 10 человек, не имеющих неврологических заболеваний (средний возраст 76 ± 10 лет, 6 мужчин и 4 жен-

Таблица 1

Клинические характеристики пациентов с мутациями в гене *LRKK2*

Пациент	Мутации	Пол	Возраст	Возраст начала заболевания	Симптомы БП на момент начала заболевания	Симптомы заболевания на момент осмотра				Эффективность терапии Л-ДОФА
						Т	Р	Б	ПН	
1	G2019S	М	53	36	Б, Р	+	+	+	+	Хорошая
2 ^а	»	Ж	54	38	А, Р, Т	+	+	+	+	»
3 ^а	»	М	78	59	То же	+	+	+	+	Слабая
4 ^а	»	Ж	78	68	Т	+	-	-	+	Не принимал
5	»	М	74	65	»	+	+	+	+	Хорошая
6 ^а	V1613A	Ж	79	74	»	+	-	-	+	Не принимал

Примечание. А — акинезия, Т — тремор, Р — ригидность, Б — брадикинезия, ПН — постоуральная нестабильность, ^а Пациенты, вошедшие в повторное исследование через 3 года.

Таблица 2

Структура используемых в исследовании праймеров и зондов

<i>FAS</i>	Прямой	5'-atg-cag-aag-atg-tag-att-gtg-3'
	Обратный	5'-gtc-cgg-gtg-cag-ttt-att-tc-3'
	Зонд	5'-(FAM)at-gaa-gga-cat-ggc-tta-gaa-g(RTQ1)-3'
<i>BCL-2</i>	Прямой	5'-tga-cag-agg-atc-atg-ctg-ta-3'
	Обратный	5'-aac-gtg-cct-cat-gaa-ata-aag-a-3'
	Зонд	5'-(FAM)aa-tac-aac-atc-aca-gag-gaa-gta-ga(RTQ1)-3'
<i>GNB2L1</i>	Прямой	5'-gaa-tac-cct-ggg-tgt-gtg-caa-3'
	Обратный	5'-gga-cac-aag-aca-ccc-act-ctg-a-3'
	Зонд	5'-(R6G)ta-cac-tgt-cca-gga-tga-ga(BHQ1)-3'

щины); контрольная группа 2—9 человек не имели неврологических заболеваний (средний возраст 60±6 лет, 4 мужчин и 5 женщин). Все индивидуумы, вошедшие в настоящее исследование, являлись жителями Санкт-Петербурга. Группы сравнения сопоставимы по полу и возрасту ($P > 0.05$). Данный проект одобрен этическим комитетом С.-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова.

Условия культивирования лимфоцитов периферической крови. Лимфоциты выделяли из свежесобранной цельной крови методом центрифугирования в градиенте Фиколла (Натвиг и др., 1980), отмывали и ресуспендировали в среде RPMI-1640 с 10 % фетальной сыворотки и инкубировали в течение 1—48 ч при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂.

Определение уровней мРНК генов *FAS* и *BCL-2*. Суммарную клеточную РНК получали при помощи набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия). Чистоту РНК оценивали по отношению поглощения при длинах волн 260 и 280 нм (критерий чистоты 1.8). кДНК получали в реакции обратной транскрипции с использованием набора iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, США).

Уровни экспрессии генов *FAS* и *BCL-2* оценивали методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием зонда TagMan на приборе ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, США). В качестве референсного гена использовали ген *GNB2L1* (guanine nucleotide binding protein или G protein). Последовательности используемых в исследовании праймеров и зондов указаны в табл. 2. От-

носительное содержание мРНК генов *FAS* и *BCL-2* рассчитывали методом стандартных кривых согласно методическим указаниям фирмы-изготовителя.

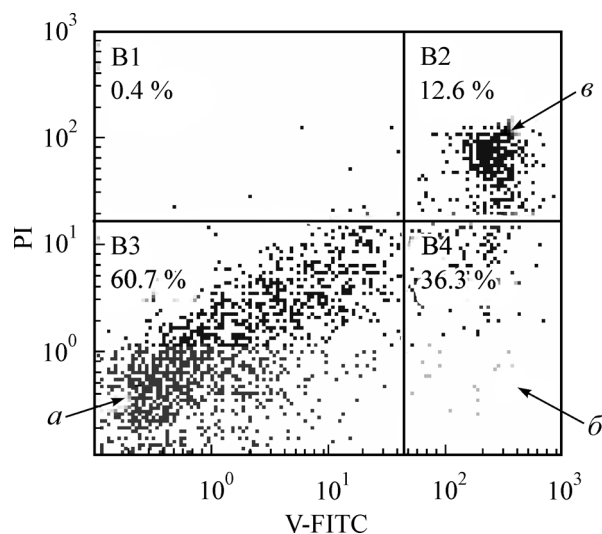


Рис. 1. Анализ апоптотических клеток методом проточной цитометрии с помощью двойной метки Annexin V-FITC — пропидий йодид (PI).

a — Annexin V/PI-/- — живые клетки; *б* — Annexin V/PI+/- — клетки, вошедшие в раннюю стадию апоптоза; *в* — Annexin V/PI+/+ — клетки, вошедшие в поздний апоптоз, и некротические клетки. Указана доля (%) апоптотических клеток по отношению к общему количеству клеток.

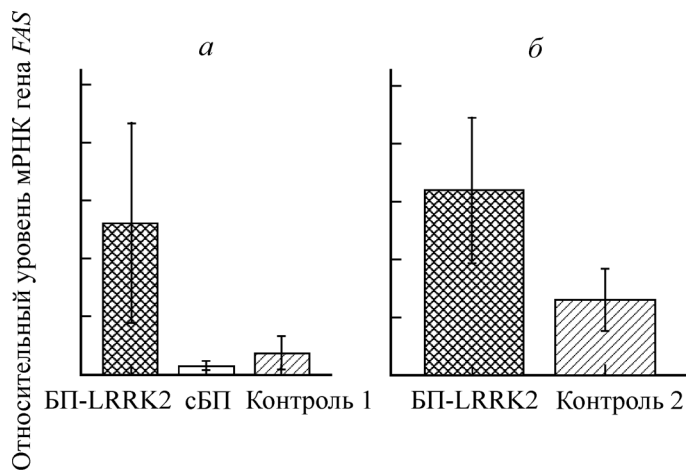


Рис. 2. Относительный уровень мРНК гена *FAS* в лимфоцитах периферической крови (\pm SE) у групп пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП (БП-*LRRK2*), со спорадической формой БП (сБП) и у контрольной группы.

a — исследование 2007 г.; *b* — исследование лимфоцитов тех же пациентов *LRRK2*-ассоциированной БП 2010 г.

Апоптоз лимфоцитов периферической крови оценивали методом проточной цитофлуориметрии (рис. 1) с использованием набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kiti (BD Pharmingen, США) на проточном цитометре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США).

Для каждого измерения регистрировали суммарную долю клеток, находящихся на ранних и поздних стадиях апоптоза, от общего количества клеток.

Статистическую обработку результатов провели при помощи программы SPSS 12. Показатели, полученные для различных групп, сравнивали с помощью непараметрического *U*-теста Манна—Уитни ($P < 0.05$ принимали за значимый уровень достоверности).

Результаты

Относительные уровни мРНК генов *FAS* и *BCL-2* определены в лимфоцитах периферической крови у 6 пациентов с мутациями в гене *LRRK2*, 12 пациентов со спорадической формой БП и 10 не имеющих неврологических заболеваний индивидуумов (контроль 1). Наблюдали статистически значимое увеличение относительного уровня мРНК гена *FAS* у пациентов с мутациями в гене

Таблица 3

Уровни спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП (БП-*LRRK2*) и контрольной группы

Группы	Количество лимфоцитов, %		
	1 ч	24 ч	48 ч
БП- <i>LRRK2</i> ($n = 4$)	6.18 ± 4.48	9.875 ± 3.31 $P = 0.016$	10.25 ± 3.09 $P = 0.031$
Контроль ($n = 9$)	3.33 ± 2.00	4.76 ± 2.40	6.42 ± 3.34

Примечание. *P* — уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными показателями в контроле.

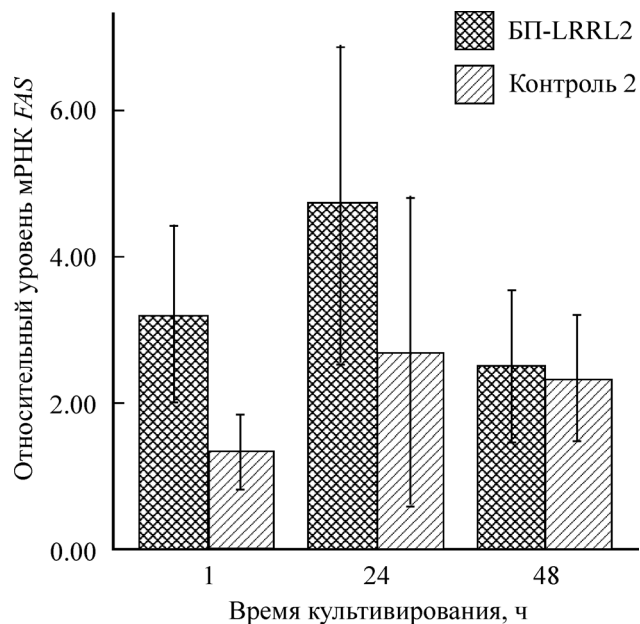


Рис. 3. Относительный уровень мРНК гена *FAS* в лимфоцитах периферической крови (\pm SE) у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП (БП-*LRRK2*) и в контроле 2 через 1, 24 и 48 ч.

LRRK2 по сравнению с пациентами с сБП ($P < 0.002$) и контролем 1 ($P < 0.05$) (рис. 2). При этом не выявлено достоверных различий в уровне мРНК гена *FAS* в группе с сБП и в контроле 1 ($P > 0.05$). Статистически значимых различий между уровнями мРНК гена *BCL-2* в лимфоцитах периферической крови в трех группах не выявлено ($P > 0.05$).

Через 3 года были доступны 4 из 6 ранее обследованных пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП (табл. 1). Мы сформировали новую контрольную группу (контроль 2), состоящую из 9 индивидуумов, в которую вошли два лица из группы контроль 1. В данных группах была проведена оценка спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови (табл. 3), а также измерен уровень мРНК гена *FAS* при культивировании лимфоцитов в стандартных условиях (при 37°C в атмосфере 5% CO_2) в течение 1, 24 и 48 ч. Статистически значимое увеличение уровня спонтанного апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП по сравнению с контролем наблюдали через 24 и 48 ч культивирования ($P < 0.016$ и $P < 0.031$ соответственно). Повышенный уровень мРНК гена *FAS* лимфоцитов крови у пациентов с *LRRK2*-ассоциированной БП по сравнению с контрольной группой наблюдали через 1 и 24 ч культивирования ($P < 0.03$ и $P < 0.05$ соответственно) (рис. 3).

Обсуждение

Нарушение регуляции апоптоза дофаминергических нейронов черной субстанции рассматривается в настоящее время как один из возможных механизмов их гибели при БП. Лимфоциты периферической крови часто используются для изучения механизма патогенеза нейродегенеративных заболеваний в силу схожести синтеза и обмена дофамина в клетках иммунной и нейрональной систем (Cosentino et al., 1999). Ранее в лимфоцитах периферической крови у пациентов с сБП обнаружены увеличение

количества белка Fas, усиление активности каспаз 3 и 9 и снижение экспрессии гена *BCL-2* (Blandini et al., 2004; Salora et al., 2010). Необходимо отметить, что в вышеуказанные исследования включали гетерогенные группы пациентов с БП неизвестной этиологии. При этом исследовании образцов крови пациентов с наследственными формами БП выявили повышенный уровень апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с мутацией в гене альфа-синуклеина (Battisti et al., 2008).

В настоящей работе мы показали усиление экспрессии мРНК гена *FAS* и повышение уровня спонтанного апоптоза через 24 ч в лимфоцитах периферической крови у пациентов с LRRK2-ассоциированной БП. Изменения в уровне экспрессии мРНК гена *BCL2* не обнаружено.

В экспериментах *in vitro* показали, что киназа LRRK2 взаимодействует с FADD и активирует каспазу 8, образуя активный мультибелковый комплекс, который запускает апоптоз по внешнему пути (Ho et al., 2009). Однако вопрос о преимущественной активации апоптоза по внешнему пути перед внутренним остается открытым, поскольку продемонстрировано влияние экспрессии мутантной формы LRRK2 на процесс высвобождения цитохрома С и активацию апоптоза по внутреннему пути (Iaccarino et al., 2007).

Увеличение экспрессии *FAS* в лимфоцитах периферической крови наблюдалось ранее у пациентов с сБП (Salora et al., 2010). Однако повышение экспрессии гена *FAS* обнаруживается и при других заболеваниях (Kaplan, Sieg, 1998; Chen et al., 2004, 2007).

Усиление уровня апоптоза лимфоцитов периферической крови у пациентов с LRRK2-ассоциированной БП наряду с увеличением уровня экспрессии мРНК *FAS* дает основание предположить активацию апоптоза по внешнему пути при наличии мутации LRRK2.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 09-04-00934-а).

Список литературы

Натвиг Дж. Б., Перлманн П., Визгель Х. 1980. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. М.: Медицина. 280 с.

Battisti C., Formichi P., Radi E., Federico A. 2008. Oxidative-stress-induced apoptosis in PBLs of two patients with Parkinson's disease secondary to alpha-synuclein mutation. *J. Neurol. Sci.* 15 : 120—124.

Blandini F., Cosentino M., Mangiagalli A., Marino F., Samuele A., Rasini E., Fancellu R., Tassorelli C., Pacchetti C., Martignoni E., Riboldazzi G., Calandrella D., Lecchini S., Frigo G., Nappi G. 2004. Modifications of apoptosis-related protein levels in lymphocytes of patients with Parkinson's disease. The effect of dopaminergic treatment. *J. Neural. Transm.* 111 : 1017—1030.

Calopa M., Bas J., Callén A., Mestre M. 2010. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in Parkinson patients. *Neurobiol. Dis.* 38 : 1—7.

Chen D. Y., Hsieh T. Y., Hsieh C. W., Lin F. J., Lan J. L. 2007. Increased apoptosis of peripheral blood lymphocytes and its association with interleukin-18 in patients with active untreated adult-onset Still's disease. *Arthritis. Rheum.* 57 : 1530—1538.

Chen L., Yang P. Z., Zhou H. Y., Huang X. K., Zhong H., Xie C. F. 2004. Increased expression of Fas and FasL mRNA in peripheral blood lymphocytes in Vogt—Koyanagi—Harada syndrome. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 40(8) : 507—509.

Cosentino M., Marino F., Bombelli R., Ferrari M., Lecchini S., Frigo G. 1999. Endogenous catecholamine synthesis, metabolism, storage and uptake in human neutrophils. *Life Sci.* 64 : 975—981.

Fukae J., Sato S., Shiba K., Sato K. 2003. Programmed cell death-2 isoform1 is ubiquitinated by parkin and increased in the substantia nigra of patients with autosomal recessive Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 3 : 521—525.

Ho C. C., Rideout H. J., Ribe E., Troy C. M. 2009. The Parkinson's disease protein leucine-rich repeat kinase 2 transduces death signals via Fas-associated protein with death domain and caspase-8 in a cellular model of neurodegeneration. *J. Neurosci.* 29 : 1011—1016.

Iaccarino C., Crosio C., Vitale C., Sanna G. 2007. Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death. *Hum. Mol. Genetic.* 16 : 1319—1326.

Kaplan D., Sieg S. 1998. Role of the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in human immunodeficiency virus type 1 disease. *J. Virol.* 72 : 6279—6282.

Levy O. A., Malagelada C., Greene L. A. 2009. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis.* 14 : 478—500.

Mizushima N., Levine B., Cuervo A. M., Klionsky D. J. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 451 : 1069—1075.

Moos T., Jensen P. H. 2004. Absence of prostate apoptosis response-4 protein in substantia nigra of Parkinson's disease autopsies. *Acta Neuropathol.* 1 : 23—26.

Paisán-Ruiz C., Jain S., Evans E. W., Gilks W. P., Simon J., van der Brug M., López de Munain A., Aparicio S., Gil A. M., Khan N., Johnson J., Martinez J. R., Nicholl D., Carrera I. M., Pena A. S., de Silva R., Lees A., Marti-Masso J. F., Pérez-Tur J., Wood N. W., Singleton A. B. 2004. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron.* 44 : 595—600.

Pchelina S. N., Yakimovskii A. F., Emelyanov A. K., Ivanova O. N., Schwarzman A. L., Singleton A. B. 2008. Screening for LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in Russia: identification of a novel LRRK2 variant. *Eur. J. Neurol.* 5 : 692—696.

Pchelina S. N., Yakimovskii A. F., Ivanova O. N., Emeljanov A. K., Zakharchuk A. H., Schwarzman A. L. 2006. G2019S LRRK2 mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia. *Mov. Disord.* 21 : 2234—2236.

Phelouzat M. A., Laforge T., Arbogast A., Quadri R. A., Boulet S., Proust J. J. 1997. Susceptibility to apoptosis of T lymphocytes from elderly humans is associated with increased *in vivo* expression of functional Fas receptors. *Mech. Ageing Develop.* 96 : 35—46.

Smith W. W., Pei Z., Jiang H., Dawson V. L. 2006. Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat. Neurosci.* 10 : 1231—1233.

Tatton N. A. 2000. Increased caspase 3 and BAX immunoreactivity accompany nuclear GAPGH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 166 : 29—43.

West A. B., Moore D. J., Biskup S., Bugayenko A., Smith W. W., Ross C. A., Dawson V. L., Dawson T. M. 2005. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 16 842—16 847.

Yamada M., Kida K., Amutuhaire W., Ichinose F., Kaneki M. 2010. Gene disruption of caspase-3 prevents MPTP-induced Parkinson's disease in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 402 : 312—318.

APOPTOSIS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN PATIENTS
WITH LRRK2-ASSOCIATED PARKINSON'S DISEASE

T. S. Usenko,^{1,2} A. K. Emelyanov,^{1,2} A. F. Yakimovskii,² N. A. Bogankova,³
T. V. Vavilova,³ A. L. Schwarzman,¹ S. N. Pchelina^{1,2,*}

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute RAS, ² St. Petersburg State I. P. Pavlov Medical University,
and ³ St. Petersburg State Medical Academy;
* e-mail: sopchelina@hotmail.com

Mutations in the Leucine Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) gene are the most frequent cause of familial Parkinson's disease (PD). Although the precise physiological and pathological role of LRRK2 is unclear, a direct link between mutant LRRK2 and apoptosis has been suggested. Using flow cytometric analysis (PI+Annexin V(FITC)) we showed increased spontaneous apoptosis of peripheral blood lymphocytes in patients with LRRK2-associated PD compared to controls after 24 ($P < 0.016$) and 48 ($P < 0.031$) h of incubation (5% CO₂, 37 °C). We found the increased *FAS* mRNA level in peripheral blood lymphocytes of patients with LRRK2-associated PD compared to controls ($P < 0.05$) and to sporadic PD (sPD) ($P < 0.002$). Significant difference in *FAS* expression between patients with LRRK2-associated PD and controls remained after three years and was detected after 1 and 24 h during lymphocyte incubation ($P < 0.03$ and 0.05, respectively). Increased spontaneous lymphocyte apoptosis along with increased *FAS* expression in patients with LRRK2-associated PD suggests that LRRK2 mutations may lead to the activation of extrinsic apoptotic way.

Key words: apoptosis, *BCL-2*, *FAS*, *LRRK2*, lymphocytes, Parkinson's disease.