

Doi: 10.31116/tsitol.2018.05.06

## ВЛИЯНИЕ ДОФАМИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА И ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ *GATA-1*, *GATA-2* И *ZSCAN21* ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

© А. К. Емельянов,<sup>1–3, \*</sup> А. О. Лавринова,<sup>1</sup> Е. М. Литусова,<sup>1</sup> Н. А. Князев,<sup>3, 5</sup>  
 Д. Г. Кулабухова,<sup>1, 2</sup> Л. А. Гараева,<sup>1, 2</sup> И. В. Милюхина,<sup>2, 3</sup>  
 О. А. Беркович,<sup>2</sup> С. Н. Пчелина<sup>1–4</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
 Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,  
 Гатчина, Ленинградская обл., 188300,

<sup>2</sup>Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова,  
 Санкт-Петербург, 197022,

<sup>3</sup>С.-Петербургский национальный исследовательский академический университет РАН,  
 Санкт-Петербург, 1940214,

<sup>4</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376, и

<sup>5</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

\* электронный адрес: e\_anton\_gen@mail.ru

В настоящее время считается, что нарушение метаболизма пресинаптического белка альфа-синуклеина и его агрегация ассоциированы с патогенезом болезни Паркинсона (БП). Предполагается, что гибель дофаминергических нейронов при БП может быть опосредована влиянием дофамина на процесс олигомеризации альфа-синуклеина, в первую очередь путем непосредственного окисления белка. В то же время не исключается влияние дофамина на механизм регуляции экспрессии гена *SNCA*. Известно, что в регуляции экспрессии *SNCA* могут участвовать транскрипционные факторы *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21*.

В настоящем исследовании с использованием ПЦР в режиме реального времени мы оценили влияние экзогенного дофамина (100 мкМ) на уровень мРНК генов *SNCA*, *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* и уровень общего альфа-синуклеина в культивируемых лимфоцитах периферической крови (ЛПК) пациентов с БП (n = 18) и индивидуумов группы контроля (n = 14). Впервые обнаружено снижение уровня экспрессии *SNCA* в ЛПК пациентов с БП (P = 0.013), индивидуумов группы контроля (P = 0.004), а также в объединенной группе, включающей в себя пациентов с БП и индивидуумов группы контроля (P = 0.001) при действии дофамина. При оценке уровня общего альфа-синуклеина выявлена тенденция к его уменьшению в ЛПК индивидуумов контрольной группы (P = 0.068), а также в объединенной группе пациентов с БП и индивидуумов группы контроля (P = 0.059) при сравнении обработанных и не обработанных дофамином клеток. Показано повышение уровня мРНК гена *ZSCAN21* в ЛПК индивидуумов контрольной группы (P = 0.022), а также гена *GATA-1* в ЛПК группы пациентов с БП (P = 0.019), культивированных в присутствии дофамина. Также обнаружено увеличение уровней мРНК генов *GATA-1*, *GATA-2*, *ZSCAN21* в ЛПК при действии дофамина в объединенной группе пациентов с БП и индивидуумов контрольной группы (P = 0.027, 0.029 и 0.002 для *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* соответственно). Таким образом, полученные данные впервые показывают влияние дофамина на уровень мРНК генов *SNCA*, *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* в культивируемых ЛПК пациентов с БП и индивидуумов контрольной группы, а также дают основание предполагать возможное влияние дофамина на регуляцию экспрессии *SNCA*.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, альфа-синуклеин, дофамин, ген *SNCA*, гены транскрипционных факторов *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21*, лимфоциты периферической крови.

Принятые сокращения: БП — болезнь Паркинсона, ДН — дофаминергические нейроны, ИФА — иммуноферментный анализ, ЛПК — лимфоциты периферической крови, ТФ — транскрипционный фактор, Л-ДОФА — 3,4-диоксифенилаланин.

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное нейродегенеративное заболевание, ключевым звеном патогенеза которого является агрегация пресинаптического белка альфа-синуклеина в дофаминергических нейронах

(ДН) черной субстанции мозга человека (Eller, Williams, 2011; Giráldez-Pérez et al., 2014). Основным гистопатологическим признаком этого заболевания является обнаружение в цитоплазме клеток небольших белковых включе-

ний телец Леви, преобладающим компонентом которых является альфа-синуклеин (Kalia, Lang, 2015). К настоящему времени в исследованиях *in vitro* и на модельных животных показано, что увеличение экспрессии гена *SNCA* способствует формированию нейротоксических олигомерных форм альфа-синуклеина (Feany, Bender, 2000; Roberts, Brown, 2015; Roberts et al., 2015). Дупликация и трипликация гена приводит к развитию наследственных форм БП (Singleton, 2003; Chartier-Harlin et al., 2004). Полиморфные варианты *SNCA*, ассоциированные с повышением его экспрессии, считаются фактором риска развития БП (Maraganore, 2006; Pankratz et al., 2009; Edwards et al., 2010; Emelyanov et al., 2013).

Следует отметить, что, несмотря на экспрессию *SNCA* и синтез альфа-синуклеина в различных клетках организма человека, развитие БП-ассоциированной нейродегенерации затрагивает преимущественно конкретную область мозга, приводя к гибели ДН, осуществляющих синтез, высвобождение в пресинаптическую щель, обратный захват и метаболизм дофамина. Считается, что нарушение гомеостаза дофамина в ДН может способствовать развитию нейродегенерации при БП. Сегодня появляется все больше данных, полученных как в экспериментах *in vitro*, так и на нейрональной клеточной модели, показывающих, что увеличение концентрации экзогенного дофамина влечет за собой повышение уровня агрегации альфа-синуклеина в клетке (Lee et al., 2011; Lee et al., 2015).

Известно, что увеличение концентрации дофамина может приводить к появлению модифицированных форм альфа-синуклеина, усиливая агрегацию белка и нарушая его деградацию в клетке (Conway, 2001; Burke et al., 2008; Lee et al., 2011; Planchard et al., 2014). Так, окисленные формы дофамина способны образовывать аддукты с альфа-синуклеином, приводя к усилению олигомеризации и стабилизации нейротоксичных протофибрилл альфа-синуклеина (Conway, 2001). Следует отметить немаловажную роль дофамина в стимулировании секреции олигомерных форм агрегатов альфа-синуклеина нейронами, способных инициировать агрегацию белка в соседних клетках (Lee et al., 2011; Planchard et al., 2014). Несмотря на обилие данных о влиянии дофамина на олигомеризацию альфа-синуклеина, его участие в регуляции экспрессии *SNCA* остается малоизученным.

Одним из возможных механизмов регуляции экспрессии *SNCA* при действии дофамина может являться регуляция с помощью транскрипционных факторов (ТФ). К настоящему времени обнаружено несколько ТФ, потенциально участвующих в этом процессе, — C/EBP $\beta$ , GATA-1, GATA-2, ZSCAN21, ZNF219 и p53 (Guhathakurta et al., 2017). Большинство из них имеет белковый домен типа цинковых пальцев и сайты связывания либо в промоторе, либо в первом или втором интронах *SNCA* (Scherzer et al., 2008; Clough et al., 2009; Brenner et al., 2015; Guhathakurta et al., 2017).

В настоящем исследовании мы предположили, что гибель ДН при БП может быть опосредована влиянием дофамина на процесс олигомеризации альфа-синуклеина за счет влияния последнего на механизмы регуляции экспрессии *SNCA*. Таким образом, целью настоящей работы явилось изучение влияния дофамина на экспрессию генов *SNCA*, *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* в экспериментах *in vitro*.

## Материал и методика

Обследуемые группы. В исследовании участвовали 18 пациентов (8 мужчин и 10 женщин) с БП, не принимающих препаратов Л-ДОФА, и 14 индивидуумов (5 мужчин и 9 женщин) контрольной группы без неврологических заболеваний. Средний возраст пациентов с БП составлял  $63.6 \pm 7.6$  года, а средний возраст в начале заболевания —  $60.3 \pm 7.4$  года. Средний возраст контрольной группы составлял  $62.1 \pm 7.6$  года. Пациентов с БП обследовали в центре нейродегенеративных заболеваний Института экспериментальной медицины, а индивидуумов группы контроля — в консультационно-диагностическом центре Первого С.-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И. П. Павлова. Все условно здоровые индивидуумы контрольной группы проходили осмотр невролога с целью исключения неврологических заболеваний. Исследование одобрено этическим комитетом указанных медицинских учреждений и проводилось при информированном согласии всех пациентов.

Культивирование лимфоцитов периферической крови (ЛПК). ЛПК выделяли из 18 мл периферической крови центрифугированием в градиенте плотности раствора фиколла (БиолоТ, Россия). Полученные ЛПК смешивали с питательной средой и рассевали в 6-луночные планшеты по 3 мл (3 млн клеток) в каждую лунку, затем культивировали на протяжении 3 сут при 5% CO<sub>2</sub> и 37 °C в присутствии 100 мкМ гидрохлорида дофамина (далее дофамина) (Sigma, США). Использовали питательную среду RPMI 1640 Medium 1X (Thermo Scientific, США), содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки (БиолоТ, Россия) и 1% раствора антибиотика-антимикотика (Sigma, США). Полученные ЛПК хранили при 80 °C до проведения эксперимента.

Оценку жизнеспособности лимфоцитов на 3-и сут проводили на проточном цитометре EPICS XL (Beckman Coulter, США). Использовали следующие концентрации дофамина — 10, 50, 100, 200 и 300 мкМ. Контролем служили клетки без добавления в питательную среду дофамина. Для подсчета количества мертвых клеток в клеточной суспензии к ней добавляли иодид пропидия (Sigma, США) в концентрации 0.05 мг/мл. После инкубации в течение 5 мин при комнатной температуре пробы анализировали на проточном цитометре. Мертвыми считали клетки, окрашенные иодидом пропидия.

Определение уровня альфа-синуклеина в ЛПК. Лизирование ЛПК и оценку концентрации общего белка в клеточных лизатах проводили с использованием коммерческих наборов Total Protein Extraction Kit (Chemicon (Millipore), США) и Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) соответственно прилагаемым инструкциям. Содержание альфа-синуклеина оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) в клеточных лизатах, выровненных по количеству общего белка (6 мкг на лунку), используя коммерческий набор Human alpha-synuclein ELISA Kit (Thermo Scientific, США). Исследования каждого образца проводили трижды. Оптическую плотность оценивали на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США).

Оценка уровня мРНК генов *SNCA*, *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21*. Тотальную РНК выделяли из ЛПК коммерческим набором RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. кДНК получали методом обратной транскрипции с использова-

Таблица 1

Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные для оценки уровня мРНК исследуемых генов

Ген	Последовательность нуклеотидов
<i>SNCA</i>	ПР 5'-CCACTGGCTTTGTCAAAA-3' ОБР 5'-ACAGGCATATCTTCCAGAA-3'
<i>GATA1</i>	ПР 5'-TCAATTCAGCAGCCTATTCC-3' ОБР 5'-AGTTCACACACTCCCTGG-3'
<i>GATA2</i>	ПР 5'-AAGATGAATGGGCAGAAC-3' ОБР 5'-CATAAGGTGGTGGTTGTC-3'
<i>ZSCAN21</i>	ПР 5'-AGTTCGCTCAAGATCCAA-3' ОБР 5'-TTCTGCTCATCTGCTGAT-3'
<i>18SrRNA</i>	ПР 5'-CAGTAAGTGCAGGGTCATAA-3' ОБР 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGC-3'
<i>GAPDH*</i>	ПР 5'-GAAATCCCATCACCATCTTCCAGG-3' ОБР 5'-GAGCCCCAGCCTTCTCCATG-3'
<i>GNBL21</i>	ПР 5'-GAATACCCTGGGTGTGTGCAA-3' ОБР 5'-GGACACAAGACACCCACTCTGA-3'

нием набора Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase (Thermo Scientific, США) согласно условиям фирмы-производителя и хранили при 80 °С.

Уровни мРНК генов *SNCA*, *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21*, а также референсных генов *GAPDH*, *18sRNA* и *GNBL21* оценивали с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческого набора, содержащего краситель-интеркалятор SYBR Green 1 (Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad, США) на приборе CFX96 (BioRad, США).

В экспериментах использовали олигонуклеотиды фирмы ДНК-Синтез (Москва). Праймеры разработали с помощью программы Primer Expreee 3.0 (табл. 1). Каждый образец амплифицировали в трех повторах с целью минимизации отклонения результатов. Относительный уровень мРНК оценивали методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS 12.0. Проверку полученных вариационных рядов на соответствие нормальному распределению проводили методом Шапиро—Уилка. Для попарного сравнения вариационных рядов использовали критерий Манна—Уитни. Сравнение групп при проведении оценки выживаемости ЛПК проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Значения считали статистически значимыми при  $P < 0.05$ . Данные представлены в виде медиан с указанием минимума и максимума. Количество жизнеспособных клеток представлено в % в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение среднего.

Использованные реактивы: фиколл (БиолоТ, Россия); гидрохлорид дофамина (Sigma, США); RPMI 1640 Medium 1X (Thermo Scientific, США); GeneJET RNA purification Kit (Thermo Scientific, США); RNeasy Mini Kit (Qiagen, США); Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase (Thermo Scientific, США); SYBR Green 1 (Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix, Bio-Rad, США); Human alpha-synuclein ELISA Kit (Thermo Scientific, США); Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США).

## Результаты

В ЛПК (всех индивидуумов исследуемых групп), культивируемых в присутствии в питательной среде дофамина, определили уровень мРНК генов *SNCA*, *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* и уровень общего альфа-синуклеина. В результате проведенных экспериментов по оценке влияния дофамина на жизнеспособность ЛПК показано незначительное снижение количества жизнеспособных клеток при концентрации дофамина 100 мкМ ( $95.23 \pm \pm 0.46$  %) по сравнению с контролем ( $97.22 \pm 0.21$  %), в то время как при 200 мМ и более наблюдали существенное снижение доли жизнеспособных клеток (рис. 1). Основываясь на полученных результатах и данных литературы, в последующих экспериментах мы использовали концентрацию дофамина 100 мкМ.

При культивировании ЛПК в течение 3 сут в присутствии 100 мМ дофамина обнаружено уменьшение уровня мРНК *SNCA* в ЛПК, культивируемых в присутствии дофамина, по сравнению с клетками, культивируемыми без него, как в случае группы пациентов с БП (0.057 (0.001—0.32) и 0.28 (0.003—0.71) соответственно) ( $P = 0.013$ ) (рис. 2, а), так и в контрольной группе (0.067 (0.019—0.32) и 0.15 (0.082—0.55) соответственно) ( $P = 0.004$ ) (рис. 2, б).

Также показано увеличение уровня мРНК гена *GATA-1* в ЛПК группы пациентов с БП при добавлении в клеточную среду дофамина ( $P = 0.019$ ), в то время как в ЛПК индивидуумов контрольной группы различий не выявлено ( $P = 0.448$ ) (табл. 2).

В ходе исследования обнаружено повышение уровня мРНК гена *ZSCAN21* в ЛПК индивидуумов контрольной группы при их культивировании в присутствии дофамина ( $P = 0.022$ ) (табл. 2). При этом различий по данному показателю в ЛПК группы пациентов с БП не обнаружено ( $P = 0.083$ ) (табл. 2).

Также не показано влияние дофамина на уровень мРНК гена *GATA-2* в ЛПК, как группы пациентов с БП ( $P = 0.118$ ), так и индивидуумов контрольной группы ( $P = 0.272$ ) (табл. 2).

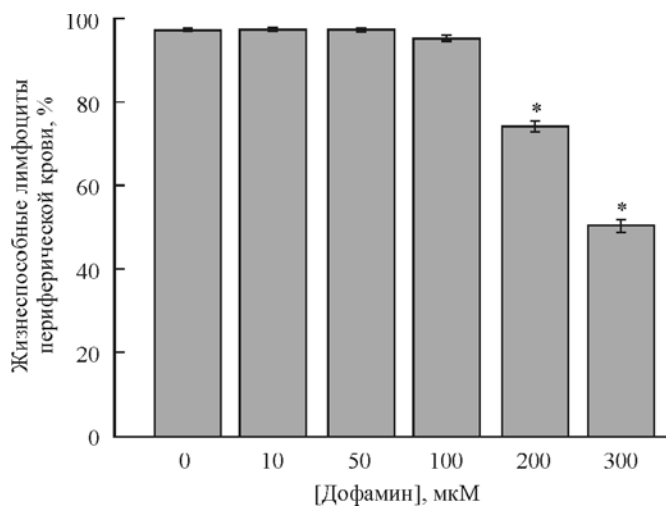


Рис. 1. Количество жизнеспособных лимфоцитов периферической крови при культивировании в течение 3 сут в присутствии разных концентраций дофамина.

\* $p < 0.05$  по сравнению с контролем (0 мкМ).

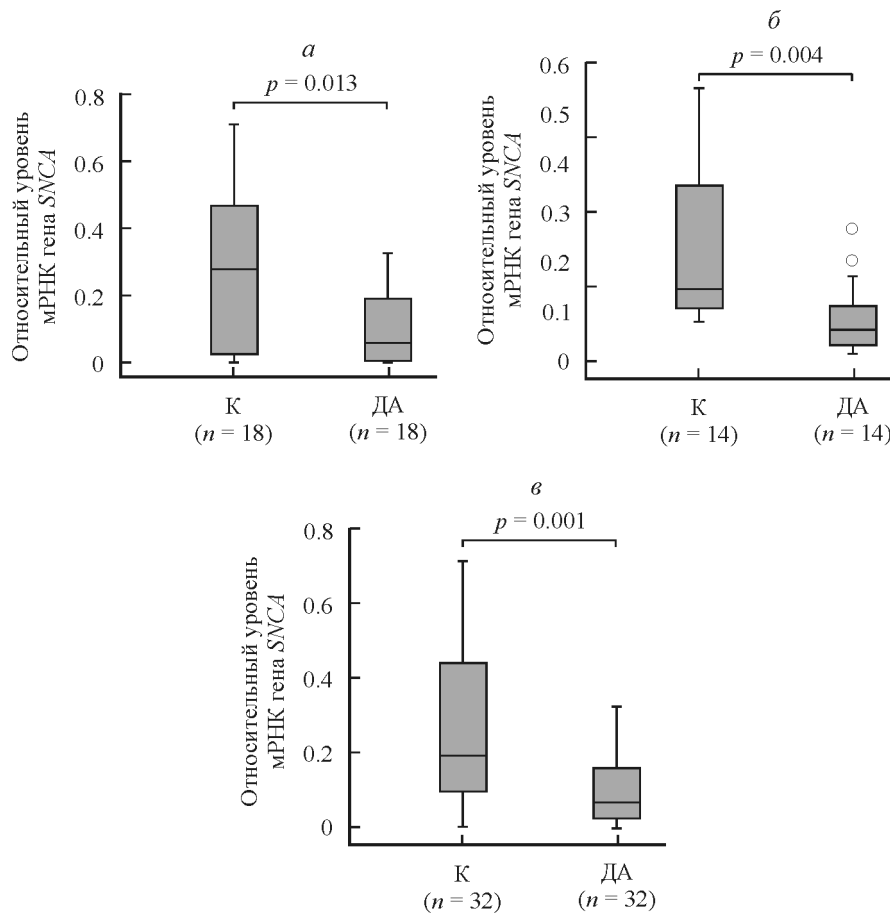


Рис. 2. Относительный уровень мРНК гена *SNCA* в лимфоцитах периферической крови (ЛПК) при культивировании в присутствии 100 мкМ дофамина (ДА) и без него (К).

Анализ ЛПК проводили для группы пациентов с болезнью Паркинсона (а), индивидуумов контрольной группы (б) и объединенной группы, включающей в себя пациентов с болезнью Паркинсона и индивидуумов контрольной группы (в).

Т а б л и ц а 2

Относительный уровень мРНК генов *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* в ЛПК исследуемых групп

Исследуемая группа		Уровень мРНК <sup>а</sup>		
		<i>GATA-1</i>	<i>GATA-2</i>	<i>ZSCAN21</i>
Пациенты с БП	ЛПК	0.0014 (0.000005—0.0073)	0.0035 (0.00097—0.029)	0.1 (0.023—0.26)
	ЛПК + ДА <sup>б</sup>	0.0044 (0.00069—0.015)	0.0067 (0.0018—0.05)	0.18 (0.03—0.66)
	<i>P</i> ; n	<i>P</i> = 0.019; n = 14	<i>P</i> = 0.118; n = 13	<i>P</i> = 0.083; n = 16
Контрольная группа	ЛПК	0.0016 (0.00028—0.0066)	0.01 (0.00059—0.037)	0.11 (0.05—0.5)
	ЛПК + ДА <sup>б</sup>	0.0019 (0.00032—0.013)	0.018 (0.0014—0.041)	0.22 (0.061—0.53)
	<i>P</i> ; n	<i>P</i> = 0.488; n = 12	<i>P</i> = 0.272; n = 15	<i>P</i> = 0.022; n = 16
Объединенная группа БП и контрольной	ЛПК	0.0014 (0.00005—0.0073)	0.0068 (0.00059—0.037)	0.1 (0.023—0.28)
	ЛПК + ДА <sup>б</sup>	0.003 (0.00032—0.015)	0.016 (0.0013—0.068)	0.2 (0.044—0.66)
	<i>P</i> ; n	<i>P</i> = 0.027; n = 26	<i>P</i> = 0.029; n = 29	<i>P</i> = 0.002; n = 31

Примечание. <sup>а</sup> Данные представлены в виде медианы (мин—макс). <sup>б</sup> Здесь и в табл. 3 ДА — дофамин.

Т а б л и ц а 3

## Уровень общего альфа-синуклеина в ЛПК исследуемых групп

Исследуемая группа, n	Концентрация альфа-синуклеина, <sup>a</sup> нг/мл		P
	ЛПК	ЛПК + ДА	
Пациенты с БП, n = 13	4.3 (0.2—13.5)	3.1 (0.2—11.2)	0.397
Контрольная, n = 13	6 (0.7—15.4)	2.6 (0.4—7.6)	0.068
Объединенная группа пациентов с БП и контрольной, n = 26	4.6 (0.2—15.4)	2.9 (0.2—11.2)	0.059

Примечание. <sup>a</sup> Данные представлены в виде медианы (мин—макс). <sup>b</sup> ЛПК — лимфоциты периферической крови.

Следует отметить, что при сравнении группы пациентов с БП и индивидуумов контрольной группы статистически значимых различий в уровне мРНК генов *SNCA*, *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* как в случае культивирования ЛПК в присутствии дофамина, так и без него не обнаружено (ЛПК, культивируемые в присутствии дофамина: *SNCA* —  $P = 0.785$ , *GATA-1* —  $P = 0.32$ , *GATA-2* —  $P = 0.337$ , *ZSCAN21* —  $P = 0.546$ , ЛПК, культивируемые в отсутствие дофамина: *SNCA* —  $P = 0.942$ , *GATA-1* —  $P = 0.709$ , *GATA-2* —  $P = 0.183$ , *ZSCAN21* —  $P = 0.309$ ).

Принимая во внимание отсутствие указанных различий, мы объединили пациентов с БП и индивидуумов группы контроля в одну общую группу.

Так, в общей группе пациентов с БП и индивидуумов группы контроля обнаружено уменьшение уровня мРНК *SNCA* в ЛПК при действии на них дофамина (0.066 (0.001—0.33) по сравнению с культивированием ЛПК без дофамина (0.19 (0.003—0.71)) ( $P = 0.001$ ) (рис. 2, в).

Оценка влияния дофамина на уровень мРНК генов *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* в ЛПК общей группы пациентов с БП и индивидуумов группы контроля позволила выявить увеличение ее уровня для каждого гена при сравнении ЛПК, культивируемых в отсутствие и в присутствии дофамина ( $P = 0.027$ , 0.029 и 0.002 соответственно для указанного порядка генов) (табл. 2).

При оценке уровня общего альфа-синуклеина выявлена тенденция к его уменьшению в ЛПК индивидуумов контрольной группы в случае добавления в питательную среду дофамина по сравнению с клетками, культивируемыми в его отсутствие ( $P = 0.068$ ). При сравнении уровня альфа-синуклеина в ЛПК группы пациентов с БП и индивидуумов группы контроля как в случае обработки клеток дофамином, так и без нее статистически значимых различий обнаружено не было ( $P = 0.57$  и 0.86 соответственно). При этом в ЛПК общей группы пациентов и контроля наблюдалась тенденция к уменьшению уровня общего альфа-синуклеина ( $P = 0.059$ ) (табл. 3).

## Обсуждение

Все больше исследований свидетельствует о том, что причиной увеличения уровня альфа-синуклеина в клетках, приводящего к формированию его нейротоксических агрегатов при БП, может являться нарушение регуляции экспрессии *SNCA*. Считается, что существует несколько вариантов регуляции его экспрессии: эпигенетическая (метилирование и посттрансляционные модификации гистонов), посттранскрипционная (миРНК и альтернативный сплайсинг), регуляция за счет наличия в

регуляторной области гена однонуклеотидных замен (однонуклеотидный полиморфизм) и регуляция на уровне транскрипции (ТФ). В настоящем исследовании мы рассматривали транскрипционный механизм регуляции экспрессии *SNCA* при действии дофамина на ЛПК и его ассоциацию с БП. Известно, что дофамин является стрессовым агентом для различных клеток, а его повышение в цитоплазме ДН может приводить к их гибели (Barzilai et al., 2001; Mosharov et al., 2009). Все более многочисленными становятся данные, свидетельствующие о влиянии экзогенного дофамина на олигомеризацию альфа-синуклеина (Conway, 2001; Burke et al., 2008; Lee et al., 2011; Planchard et al., 2014).

В настоящем исследовании мы оценивали влияние экзогенного дофамина на уровень экспрессии *SNCA* и ТФ *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* в культивируемых ЛПК пациентов с БП и индивидуумов группы контроля. Следует отметить, что в большинстве исследований на клеточных культурах используемая концентрация дофамина обычно значительно превышает физиологические концентрации последнего в периферической крови здоровых людей ( $21.8 \pm 9.5$  нг/л) (Ambade et al., 2009).

Для оценки влияния дофамина на жизнедеятельность клеток и как следствие — на экспрессию *SNCA* мы выбрали концентрацию дофамина 100 мкМ. Влияние данной концентрации дофамина на уровень экспрессии различных генов показано ранее на клеточных культурах (Gomez-Santos et al., 2005; Matsumoto et al., 2010; Lee et al., 2015). Интересно, что при физиологических концентрациях дофамин не проявляет токсичности, однако нарушения в процессе высвобождения дофамина и(или) его метаболизме могут приводить к проявлению нейротоксичности, вызванной, как предполагается, окислительным стрессом, нейровоспалением и развитием апоптоза. Ранее на различных клеточных культурах, в том числе и ЛПК, было показано, что экзогенные концентрации дофамина в диапазоне 0.1—1.0 мМ вызывают увеличение уровня апоптоза и аутофагии, приводя к изменению профиля экспрессии различных генов (Barzilai et al., 2001; Colombo et al., 2003; Gomez-Santos et al., 2005). В то же время этот диапазон концентраций дофамина соответствует физиологическому уровню дофамина в ДН (Lichtensteiger, 1970; Jonsson, Sachs, 1971; Michel, Nefli, 1990). Также известно, что его концентрация в стриатуме млекопитающих составляет 70—130 мкМ, в то время как внутривезикулярная концентрация может достигать 100 мМ (Kopin et al., 1993).

В качестве модели исследования мы выбрали ЛПК, поскольку для них показан ряд ключевых процессов метаболизма дофамина, подобных тем что наблюдаются в

ДН. Так, на мембране лимфоцитов представлены все виды рецепторов дофамина, дофаминовый транспортер, в них происходит синтез дофамина с участием тирозингидроксилазы (Cosentino, 2002; McKenna et al., 2002; Pellicano et al., 2011).

При введении выбранной нами концентрации дофамина в культуральную среду в настоящем исследовании впервые показано снижение уровня экспрессии *SNCA* в ЛПК, полученных как у пациентов с БП, так и у индивидуумов группы контроля. Следует отметить, что ранее в исследовании на клеточной культуре НЕК-293 показано, что добавление экзогенного дофамина (100 мкМ) приводит к гипометилированию регуляторной области *SNCA* и повышению его экспрессии (Matsumoto et al., 2010). Аналогично полученным нами данным, в другом исследовании показано снижение уровня экспрессии *SNCA* при культивации ЛПК пациентов с БП ( $n = 6$ ) в присутствии предшественника дофамина Л-ДОФА (Schmitt et al., 2015), а также выявлено гиперметилирование регуляторной области интрона 1 *SNCA*. Таким образом, нельзя исключить, что наблюдаемое в нашем исследовании снижение уровня экспрессии *SNCA* может быть опосредовано гиперметилированием регуляторных областей гена, что требует дальнейшего исследования.

Нами не обнаружено различий в уровне экспрессии *SNCA* в ЛПК группы пациентов с БП и индивидуумов группы контроля как в случае добавления в питательную среду дофамина, так и без него. Ранее отсутствие изменений в экспрессии *SNCA* отмечали в ряде исследований, объектом изучения которых являлись ЛПК пациентов с БП и индивидуумов контрольной группы (Tan et al., 2005; Fuchs et al., 2008; Ai et al., 2014).

При оценке концентрации альфа-синуклеина в лизатах ЛПК выявлена тенденция к его уменьшению у индивидуумов контрольной группы, а также в общей группе пациентов с БП и индивидуумов группы контроля при добавлении к клеткам дофамина. Ранее в ряде работ показано отсутствие различий уровня общего альфа-синуклеина в ЛПК у пациентов с БП при сравнении с индивидуумами контрольной группы (Fuchs et al., 2008; Brighina et al., 2010; Pchelina et al., 2011).

Помимо оценки влияния дофамина на экспрессию *SNCA* в настоящем исследовании мы впервые исследовали его влияние на уровень экспрессии ряда ключевых ТФ — *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21*, участвующих в регуляции экспрессии *SNCA*. Известно, что *GATA-1* относится к эритроид-специфичным ТФ и что ему отводится ключевая роль в конечной дифференцировке и созревании эритроидной клетки. При этом данный ген практически не экспрессируется в тканях мозга, в то время как для ТФ *GATA-2* показан высокий уровень экспрессии в черной субстанции и фронтальной части коры головного мозга (Guhathakurta et al., 2017). Другой изучаемый нами ТФ, *ZSCAN21*, в отличие от указанных выше в своем составе кроме домена «цинковых пальцев» имеет еще и домен SCAN (Edelstein, Collins, 2005). Данный ТФ экспрессируется в различных тканях человека, включая ткани центральной нервной системы (Su et al., 2004). Выбранные ТФ являются одними из основных ТФ, регулирующих экспрессию гена *SNCA*, и имеют сайты связывания в регуляторных областях гена (Guhathakurta et al., 2017).

В настоящем исследовании нами впервые показано повышение уровня мРНК гена *ZSCAN21* ( $P = 0.022$ ) в ЛПК, полученных у индивидуумов группы контроля, а также гена *GATA-1* в ЛПК группы пациентов с БП

( $P = 0.019$ ) при культивировании ЛПК в присутствии дофамина. Также наблюдали увеличение уровней мРНК генов *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* в ЛПК при действии дофамина в общей группе пациентов с БП и индивидуумов группы контроля ( $P = 0.027$ ,  $0.029$  и  $0.002$  для *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* соответственно). Следует отметить, что подобный эксперимент проводили ранее на нейрональной клеточной культуре, где было обнаружено увеличение в клетках уровня белка ТФ *C/EBP*, также участвующего в регуляции экспрессии *SNCA* при действии экзогенного дофамина (Gomez-Santos et al., 2005).

Интересно отметить, что наблюдаемое в нашей работе увеличение экспрессии генов исследуемых ТФ не сопровождалось увеличением уровня альфа-синуклеина. В связи с этим можно предположить, что регуляция экспрессии *SNCA* при действии дофамина на клетки происходит не только за счет работы исследуемых нами ТФ. Такое предположение также высказывалось и ранее в работе Дерментзакер и соавторов, где на первичной нейрональной культуре клеток различных областей мозга крысы показано, что нокдаун гена *ZSCAN21* не приводит к значительным изменениям в уровне альфа-синуклеина (Dermentzaki et al., 2016). В то же время в работе Райт и соавторов показано, что гиперэкспрессия гена *ZSCAN21* ведет к снижению уровня альфа-синуклеина в клетках SHSY5Y (Wright et al., 2013).

Известно, что в местах посадки ТФ на последовательность регуляторной области *SNCA* могут быть расположены CpG-островки (Jowaed et al., 2010), к цитозину которых в процессе метилирования может присоединяться метильная группа. В свою очередь гиперметилирование регуляторной области данного гена может приводить к изменению структуры сайта и к нарушению связывания с ним соответствующего ТФ.

Исходя из вышесказанного можно предположить, что наблюдаемое нами снижение экспрессии *SNCA* в ЛПК как пациентов с БП, так и индивидуумов группы контроля, а также в объединенных группах после обработки клеток дофамином может быть обусловлено в большей степени гиперметилированием регуляторной области данного гена и как следствие — нарушением связывания исследуемых нами ТФ с его регуляторной областью. В то же время выявленное при действии дофамина на ЛПК увеличение экспрессии генов *GATA-1*, *GATA-2* и *ZSCAN21* может объясняться компенсаторным эффектом клетки, направленным на повышение экспрессии *SNCA*. Однако это предположение требует дальнейшей проверки и оценки влияния дофамина на уровень указанных ТФ в лизатах ЛПК, а также исследование других ТФ, потенциально регулирующих экспрессию *SNCA*.

Отсутствие изменения экспрессии исследуемых генов ТФ и *SNCA* под действием дофамина в ЛПК при сравнении группы пациентов с БП и индивидуумов группы контроля может свидетельствовать о схожести механизма его влияния на экспрессию исследуемых генов как в норме, так и при патологии. В то же время для обнаружения более общих закономерностей влияния дофамина на ЛПК при БП требуется расширение исследуемых групп. На основании полученных данных о влиянии дофамина на уровень экспрессии *SNCA* можно предположить, что применение пациентами с БП широко используемого в клинической практике препарата Л-ДОФА может также оказывать влияние на экспрессию данного гена, что делает актуальным проспективное исследование влияния подоб-

ного класса препаратов на экспрессию SNCA в группе пациентов с БП.

Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что дофамин участвует в процессе регуляции экспрессии SNCA. Для выявления механизма дофаминопосредованной регуляции экспрессии SNCA необходимы дальнейшие исследования.

Авторы выражают большую благодарность всем участникам исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01187).

### Список литературы

- Ai S., Xu Q., Hu Y. 2014. Hypomethylation of SNCA in blood of patients with sporadic Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 337 : 123—128.
- Ambade V., Arora M., Singh P., Somani B., Basannar D. 2009. Adrenaline, noradrenaline and dopamine level estimation in depression: does it help? *Med. J. Armed Forces India.* 65 : 216—220.
- Asi Y. T., Simpson J. E., Heath P. R., Wharton S. B., Lees A. J., Revesz T., Houlden H., Holton J. L. 2014. Alpha-synuclein mRNA expression in oligodendrocytes in MSA. *Glia.* 62 : 964—970.
- Barzilai A., Melamed E., Shirvan A. 2001. Is there a rationale for neuroprotection against dopamine toxicity in Parkinson's disease? *Cell. Mol. Neurobiol.* 21 : 215—235.
- Brenner S., Wersinger C., Gasser T. 2015. Transcriptional regulation of the  $\alpha$ -synuclein gene in human brain tissue. *Neurosci. Lett.* 599 : 140—145.
- Brighina L., Prigione A., Begni B., Galbusera A., Andreoni S., Piolti R., Ferrarese C. 2010. Lymphomonocyte alpha-synuclein levels in aging and in Parkinson disease. *Neurobiol. Aging.* 31 : 884—885.
- Burke W., Kumar V., Pandey N., Panneton W. M., Gan Q., Franko M. W., O'Dell M., Li S.W., Pan Y., Chung H. D., Galvin J. E. 2008. Aggregation of  $\alpha$ -synuclein by DOPAL, the monoamine oxidase metabolite of dopamine. *Acta Neuropathol.* 115 : 193—203.
- Chartier-Harlin M., Kachergus J., Roumier C., Mouroux V., Douay X., Lincoln S., Levecque C., Larvor L., Andrieux J., Hulihan M., Waucquier N., Defebvre L., Amouyel P., Farrer M., Destee A. 2004.  $\alpha$ -Synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet.* 364 : 1167—1169.
- Clough R., Dermentzaki G., Stefanis L. 2009. Functional dissection of the  $\alpha$ -synuclein promoter: transcriptional regulation by ZSCAN21 and ZNF219. *J. Neurochem.* 110 : 1479—1490.
- Colombo C., Cosentino M., Marino F., Rasini E., Ossola M., Blandini F., Mangiagalli A., Samuele A., Ferrari M., Bombelli R., Lecchini S., Nappi G., Frigo G. 2003. Dopaminergic modulation of apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010 : 679—682.
- Conway K. 2001. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science.* 294 : 1346—1349.
- Cosentino M. 2002. Stimulation with phytohaemagglutinin induces the synthesis of catecholamines in human peripheral blood mononuclear cells: role of protein kinase C and contribution of intracellular calcium. *J. Neuroimmunol.* 125 : 125—133.
- Dermentzaki G., Paschalidis N., Politis P., Stefanis L. 2016. Complex effects of the ZSCAN21 transcription factor on transcriptional regulation of  $\alpha$ -synuclein in primary neuronal cultures and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 291 : 8756—8772.
- Edelstein L., Collins T. 2005. The SCAN domain family of zinc finger transcription factors. *Gene.* 359 : 1—17.
- Edwards T., Scott W., Almonte C., Burt A., Powell E. H., Beecham G. W., Wang L., Zuchner S., Konidari I., Wang G., Singer C., Nahab F., Scott B., Stajich J. M., Pericak-Vance M., Haines J., Vance J. M., Martin E. R. 2010. Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann. Hum. Genet.* 74 : 97—109.
- Eller M., Williams D. 2011.  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson disease and other neurodegenerative disorders. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49 : 403—408.
- Emelyanov A., Andoskin P., Yakimovskii A., Usenko T., Nuzhnyi E., Nikolaev M., Pchelina S. 2013. SNCA, LRRK2, MAPT polymorphisms and Parkinson's disease in Russia. *Parkinsonism & Related Disorders.* 19 : 1064—1065.
- Feany M., Bender W. 2000. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature.* 404 : 394—398.
- Fuchs J., Tichopad A., Golub Y., Munz M., Schweitzer K. J., Wolf B., Berg D., Mueller J. C., Gasser T. 2008. Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB J.* 22 : 1327—1334.
- Giráldez-Pérez R., Antolín-Vallespín M., Muñoz M., Sánchez-Capelo A. 2014. Models of  $\alpha$ -synuclein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 2 : 176.
- Gomez-Santos C., Barrachina M., Gimenez-Xavier P., Dalfo E., Ferrer I., Ambrosio S. 2005. Induction of C/EBP $\beta$  and GADD153 expression by dopamine in human neuroblastoma cells. *Brain Res. Bull.* 65 : 87—95.
- Gomez-Santos C., Ferrer I., Santidrian A., Barrachina M., Gil J., Ambrosio S. 2003. Dopamine induces autophagic cell death and  $\alpha$ -synuclein increase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurosci. Res.* 73 : 341—350.
- Guhathakurta S., Bok E., Evangelista B., Kim Y. 2017. Deregulation of  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease: insight from epigenetic structure and transcriptional regulation of SNCA. *Progress Neurobiol.* 154 : 21—36.
- Jonsson G., Sachs C. 1971. Uptake and accumulation of 3H-6-hydroxydopamine in adrenergic nerves. *Eur. J. Pharmacol.* 16 : 55—62.
- Jowaed A., Schmitt I., Kaut O., Wullner U. 2010. Methylation regulates alpha-synuclein expression and is decreased in Parkinson's disease patients' brains. *J. Neurosci.* 30 : 6355—6359.
- Kalia L., Lang A. 2015. Parkinson's disease. *Lancet.* 386 : 896—912.
- Kopin I. J., Siegel G. J., Agranoff B. W., Siegel G. J., Wayne A. R., Price D. L. 1993. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. In: *Basic Neurochemistry*. New York: Raven Press. 903 p.
- Lee D. J., Tseng H. C., Wong S. W., Wang Z., Deng M., Ko C. C. 2015. Dopaminergic effects on *in vitro* osteogenesis. *Bone Res.* 3 : 15020.
- Lee H., Baek S., Ho D., Suk J., Cho E., Lee S. 2011. Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers. *Exp. Mol. Med.* 43 : 216.
- Lichtensteiger W. 1970. Katecholaminhaltige Neurone in der Neuroendokrinen Steuerung prinzip, anwendung der mikrofluorimetrie. *Progress Histochem. Cytochem.* 1 : 5—8.
- Maraganore D. 2006. Collaborative analysis of  $\alpha$ -synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA.* 296 : 661.
- Matsumoto L., Takuma H., Tamaoka A., Kurisaki H., Date H., Tsuji S., Iwata A. 2010. CpG demethylation enhances alpha-synuclein expression and affects the pathogenesis of Parkinson's disease. *PLoS ONE.* 5 : e15522.
- McKenna F., McLaughlin P., Lewis B., Sibbring G. C., Cummerson J. A., Bowen-Jones D., Moots R. J. 2002. Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J. Neuroimmunol.* 132 : 34—40.
- Michel P., Hefti F. 1990. Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *J. Neurosci. Res.* 26 : 428—435.
- Mosharof E., Larsen K., Kanter E., Phillips K. A., Wilson K., Schmitz Y., Krantz D. E., Kobayashi K., Edwards R. H., Sulzer D. 2009. Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and  $\alpha$ -synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron.* 62 : 218—229.

Pankratz N., Wilk J., Latourelle J., DeStefano A. L., Halter C., Pugh E. W., Doherty K. F., Gusella J. F., Nichols W. C., Foroud T., Myers R. H., PSG-PROGENI, GenePD Investigators, Coordinators and Molecular Genetic Laboratories. 2008. Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Hum. Genet.* 124 : 593—605.

Pchelina S. N., Emelyanov A. K., Yakimovskii A. F., Miller D. W., Shabalina I. G., Drozdova A. S., Schwarzman A. L. 2011. Reduced content of alpha-synuclein in peripheral blood leukocytes of patients with LRRK2-associated Parkinson's disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* 150 : 679—681.

Pellicano C. E., Pontieri F., Fanciulli A. R., Buttarelli F. 2011. The dopaminergic system in peripheral blood lymphocytes: from physiology to pharmacology and potential applications to neuropsychiatric disorders. *Curr. Neuropharmacol.* 9 : 278—288.

Planchard M., Exley S., Morgan S., Rangachari V. 2014. Dopamine-induced  $\alpha$ -synuclein oligomers show self- and cross-propagation properties. *Protein Sci.* 23 : 1369—1379.

Roberts H., Brown D. 2015. Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric  $\alpha$ -synuclein. *Biomolecules.* 5 : 282—305.

Roberts R., Wade-Martins R., Alegre-Abarrategui J. 2015. Direct visualization of alpha-synuclein oligomers reveals previously undetected pathology in Parkinson's disease brain. *Brain.* 138 : 1642—1657.

Scherzer C., Grass J., Liao Z., Pepivani I., Zheng B., Eklund A. C., Ney P. A., Ng J., McGoldrick M., Mollenhauer B., Bresnick E. H., Schlossmacher M. G. 2008. GATA transcription factors directly regulate the Parkinson's disease-linked gene alpha-synuclein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105 : 10 907—10 912.

Schmitt I., Kaut O., Khazneh H., deBoni L., Ahmad A., Berg D., Klein C., Frohlich H., Wüllner U. 2015. L-dopa increase - $\alpha$ -synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients *in vivo* and *in vitro*. *Movement Disorders.* 30 : 1794—1801.

Singleton A. 2003. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science.* 302 : 841—841.

Su A., Wiltshire T., Batalov S., Lapp H., Ching K. A., Block D., Zhang J., Soden R., Hayakawa M., Kreiman G., Cooke M. P., Walker J. R., Hogenesch J. B. 2004. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101 : 6062—6067.

Tan E., Chandran V., Fook-Chong S., Shen H., Yew K., Teoh M., Yuen Y., Zhao Y. 2005. Alpha-synuclein mRNA expression in sporadic Parkinson's disease. *Movement Disorders.* 20 : 620—623.

Wright J. A., McHugh P. C., Pan S., Cunningham A., Brown D. R. 2013. Counter-regulation of alpha- and beta-synuclein expression at the transcriptional level. *Mol. Cell. Neurosci.* 57 : 33—41.

Поступила 24 XI 2017

#### DOPAMINE EFFECT ON THE *SNCA* AND *GATA-1*, *GATA-2*, *ZSCAN21* GENES EXPRESSION IN PARKINSON'S DISEASE

A. K. Emelyanov,<sup>1–3,\*</sup> A. O. Lavrinova,<sup>1</sup> E. M. Litusova,<sup>1</sup> N. A. Knyazev,<sup>3,5</sup> D. G. Kulabukhova,<sup>1,2</sup> L. A. Garaeva,<sup>1,2</sup> I. V. Miliukhina,<sup>2,3</sup> O. A. Berkovich,<sup>2</sup> S. N. Pchelina<sup>1–4</sup>

<sup>1</sup> Petersburg Nuclea Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Leningrad Region, 188300,

<sup>2</sup> I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022,

<sup>3</sup> Federal State Budgetary Institution of Higher Education and Science St. Petersburg National Research Academic University RAS, St. Petersburg, 194021,

<sup>4</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 194064, and

<sup>5</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

\* e-mail: e\_anton\_gen@mail.ru

Impaired metabolism of alpha-synuclein and its aggregation are implicated with the pathogenesis of Parkinson's disease (PD). Alpha-synuclein oligomerization leading to neurodegeneration was suggested to be influenced by dopamine induced oxidation. At the same time, dopamine mediated regulation of *SNCA* gene expression is not excluded. The transcription factors *GATA-1*, *GATA-2*, *ZSCAN21* were shown to regulate *SNCA* expression. We evaluated the effect of exogenous dopamine on the *SNCA*, *GATA-1*, *GATA-2*, *ZSCAN21* genes expression and alpha-synuclein levels in cultured peripheral blood lymphocytes (PBL) from PD patients ( $n = 18$ ) and controls ( $n = 14$ ). Dopamine caused a decrease in *SNCA* gene expression in the PBL from PD patients ( $P = 0.013$ ), controls ( $P = 0.004$ ) and in combined group ( $P = 0.001$ ). Also we revealed the tendency to decrease alpha-synuclein level in dopamine treated PBL from controls ( $P = 0.068$ ) and in combined group ( $P = 0.059$ ). An increased the mRNA levels of the *ZSCAN21* and *GATA-1* genes in the cultured dopamine-treated PBL from controls ( $P = 0.022$ ) and PD patients ( $P = 0.019$ ) were shown. Also it was found that dopamine increase mRNA levels of the *GATA-1*, *GATA-2*, and controls ( $P = 0.027$ , 0.029 and 0.002, respectively).

Thus, our data suggest that dopamine might influence on the *SNCA*, *GATA-1*, *GATA-2*, and *ZSCAN21* genes expression in cultured peripheral blood lymphocytes from PD patients and controls.

**Key words:** Parkinson's disease, alpha-synuclein, dopamine, *SNCA* gene, genes of *GATA-1*, *GATA-2*, *ZSCAN21* transcription factors peripheral blood lymphocytes.