

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.214.5; 577.215.3

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *GSK3B* В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ
С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

© 2011 г. Е. В. Филатова^{1*}, М. И. Шадрина¹, А. В. Карабанов², П. А. Сломинский¹,
С. Н. Иллариошкин², И. А. Иванова-Смоленская², С. А. Лимборская¹

¹Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва 123182

²Научный центр неврологии Российской академии медицинских наук, Москва 125367

Поступила в редакцию 24.06.2010 г.

Принята к печати 27.09.2010 г.

Болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, при котором происходит разрушение и гибель дофаминергических нейронов. Сравнительное изучение экспрессии генов у пациентов при раннем диагнозе болезни Паркинсона, до начала лечения, необходимо для понимания патогенеза заболевания и для поисков биомаркеров доклинической стадии патологии. Мы исследовали экспрессию гена киназы гликогенсинтазы-3-бета (*GSK3B*) в периферической крови больных в разных группах сравнения с использованием реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Сделан вывод о том, что уровни экспрессии гена *GSK3B* не могут служить биомаркером ранних стадий БП.

Ключевые слова: уровень экспрессии, *GSK3B*, болезнь Паркинсона, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

EXPRESSION OF *GSK3B* GENE IN PERIPHERAL BLOOD IN PATIENT WITH PARKINSON'S DISEASE, by E. V. Filatova^{1*}, M. I. Shadrina¹, A. V. Karabanov², P. A. Slominsky¹, S. N. Illarioshkin², I. A. Ivanova-Smolenskaya², S. A. Limborska¹ (¹Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 123182 Russia; *e-mail: FilatovaEV@img.ras.ru; ²Scientific Centre of Neurology, Russian Academy of Medical Science, Moscow, 125367 Russia). Parkinson's disease (PD) is the second most common progressive neurodegenerative disorder characterized by the degeneration of dopaminergic neurons. Detecting changes in gene expression in untreated *de novo* patients with PD is important for understanding disease pathogenesis and for identifying biomarkers for preclinical stage of PD. In this study we investigate expression of gene of Glycogen synthase kinase-3 beta (*GSK3B*) in the peripheral blood of different groups of patients with neurological diseases using reverse transcription reaction and real-time polymerase chain reaction (PCR). Our results suggest that the expression levels of *GSK3B* can't serve as a biomarker for early stages of PD.

Keywords: expression levels, *GSK3B*, Parkinson's disease, real-time polymerase chain reaction.

Болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание после болезни Альцгеймера (БА). Она обусловлена дегенерацией и гибелью дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции головного мозга. У большинства больных заболевание носит спорадический характер, и только в 10–15% случаев оно может наследоваться по моногенному аутосомному типу. К настоящему времени найдено семь генов, определяющих моногенные формы болезни Паркинсона (*PARK2*, *SNCA*, *PINK1*, *LRRK2*, *DJ-1*, *UCH-L1*, *ATP13A2*), а также целый ряд генов, кото-

рые так или иначе могут участвовать в патогенезе БП [1]. Считают, что у большинства пациентов причина заболевания обусловлена взаимодействием факторов окружающей среды и генетической конституции организма.

Первые клинические симптомы заболевания появляются после гибели 60–80% дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции [2, 3]. Однако с момента начала заболевания и до появления первых симптомов проходит около 5 лет [4], поэтому в настоящее время активно ведутся поиски биомаркеров доклинических стадий бо-

Принятые сокращения: БП – болезнь Паркинсона; БА – болезнь Альцгеймера; МКБ-10 – Международная классификация болезней, 10-го пересмотра; ПЦР – полимеразная цепная реакция; GSK-3b (Glycogen synthase kinase 3 beta) – киназа гликогенсинтазы-3-бета.

* Эл. почта: FilatovaEV@img.ras.ru

лезни. Наиболее перспективным направлением считается изучение изменений экспрессии генов-кандидатов в периферической крови.

Ранее показано, что некоторые гены моногенных форм болезни Паркинсона транскрибируются в клетках крови [5, 6]. Исследования тромбоцитов [7] или лимфоцитов [8, 9] пациентов со спорадической формой заболевания показали лишь незначительные аномалии синтеза и медиаторной функции дофамина и функционирования митохондрий. При исследовании транскриптома в периферической крови пациентов на ранних стадиях БП установлено, что изменяется экспрессия 22 различных генов [10].

Совсем недавно показано, что количество киназы гликогенсинтазы-3-бета (Glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3b) в крови пациентов с болезнью Паркинсона изменяется [11]. GSK-3b — это многофункциональная серин/треониновая протеинкиназа (КФ 2.7.11.26), участвующая в регуляторных процессах при диабете, раке, нейродегенеративных заболеваниях и воспалении [12]. Этот фермент вовлечен в регуляцию транспорта в аксонах [13, 14], который нарушается при моделировании БА у мышей и на ранних стадиях этого заболевания у людей [15, 16]. Известно, что фосфорилирование GSK-3b регулирует некоторые внутриклеточные пути [17–18], связанные с выживанием нейронов [19].

Нарушение регуляции киназы GSK-3b наблюдается при различных нейродегенеративных заболеваниях [20–22], включая болезнь Пика, прогрессирующий супрануклеарный паралич, кортикобазальную дегенерацию [20] и болезнь Хантингтона [23]. Не исключали, что эти изменения могут играть центральную роль и в патогенезе БА и БП.

Нарушение фосфорилирования специфических белков, таких как тау-белок и α -синуклеин, которое является следствием нарушения экспрессии гена киназы GSK-3b и/или ее активности, может способствовать образованию токсичных агрегатов, наблюдаемых в мозге при БА и БП [24]. Фосфорилированная форма GSK-3b обнаружена на периферии телец Леви в мозге больных БП [25]. GSK-3-зависимый апоптоз нейронов наблюдается также при моделировании БП у животных [26], что указывает на вероятное участие этой киназы в развитии болезни [11].

Известно, что ген *GSK3B* экспрессируется в клетках периферической крови человека [11, 27]. В связи с этим, в настоящей работе мы исследовали экспрессию этого гена в периферической крови пациентов с БП и в двух группах сравнения (пациентов с церебральным атеросклерозом и здоровых добровольцев).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мы исследовали две группы пациентов с БП, 15 из них не получали лечения, а 34 — получали адекватное лечение. Все больные — русские по происхождению; для постановки диагноза их исследовали по международной унифицированной оценочной шкале БП (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS) и шкале Хен-Яра (Hoehn and Yahr scores) в Научном центре неврологии Российской академии медицинских наук группой неврологов под руководством С.Н. Иллариошкина [28]. Все пациенты находились на ранней стадии заболевания (1-ая и 2-ая стадии по шкале Хен-Яра). Средний возраст пациентов — 47.8 ± 13.3 лет (среднее \pm стандартное отклонение), в диапазоне 29–75 лет. Соотношение полов — 1 : 1 во всех группах пациентов. В группах сравнения исследовано 56 неврологически здоровых добровольцев и 59 больных с церебральным атеросклерозом (ЦА, I67.2 согласно МКБ-10). Все больные и здоровые добровольцы из групп сравнения (также русские по происхождению) относились к той же возрастной категории, что и пациенты с БП. Все участники исследования дали информированное согласие на участие в проекте. Данное исследование одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии РАМН.

Образцы крови забирали в 8 ч утра натощак, затем хранили при $+4^\circ\text{C}$ не более 2 ч перед выделением РНК. Тотальную РНК выделяли из периферической крови с помощью набора QIAamp RNA Blood Mini Kit (“Qiagen”, Germany). Количество РНК определяли спектрофотометрически с применением набора Quant-iT RNA BR Assay Kit для использования с флуориметром Qubit (“Invitrogen”, USA). Одноцепочечную кДНК синтезировали трижды, используя набор RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Lithuania) и 50 нг тотальной РНК.

Относительный уровень экспрессии гена определяли при помощи ПЦР в реальном времени, основанной на технологии TaqMan. Транскрипты генов *POLR2F* и *PSMB6* амплифицировали совместно с транскриптом гена *GSK3B* в качестве генов сравнения для нормализации данных по экспрессии этого гена. Праймеры и зонды разрабатывали с помощью программного обеспечения Beacon Designer 7.02. В работе использовали последовательности, представленные в таблице.

ПЦР проводили с использованием прибора АНК-32 (Институт аналитического приборостроения, Санкт-Петербург) и реактивов для ПЦР (“Синтол”, Москва). В состав смеси для ПЦР входили: 0.2 мкл HotTaq-rescue-полимеразы (5 е.а./мкл); 3 мкл буферного раствора ($\times 10$); 3 мкл смеси dNTP (по 25 нмоль/мкл); 1.5 мкл MgCl_2 (25 нмоль/мкл); 1 мкл раствора праймеров (10 пмоль/мкл); 1 мкл раствора зондов (2.5 пмоль/мкл); 5 мкл раствора кДНК (0.02 нг/мкл); до 30 мкл доводили дважды деиони-

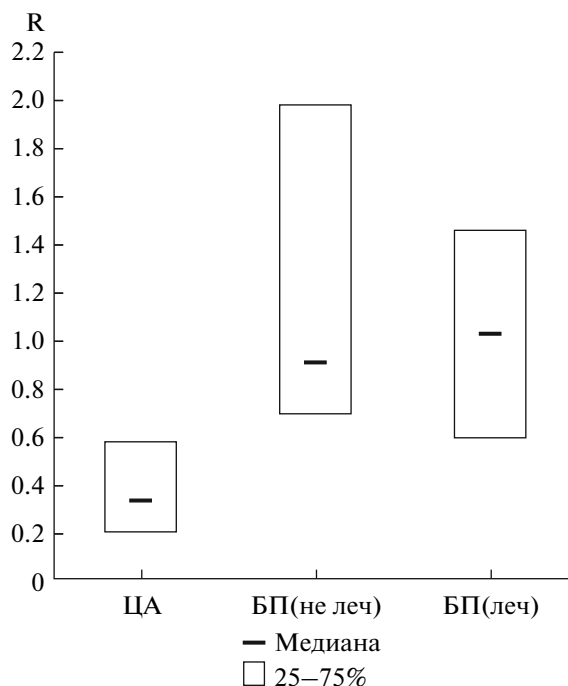
зованной водой. Условия амплификации: 10 мин при 94°C, затем 45 циклов по 50 с при 94°C и 20 с при 60°C. Опыты с каждой кДНК повторяли троекратно. Значения пороговых уровней амплификации (C_p – Crossing point) определяли при помощи метода максимума второй производной, являющегося частью программного обеспечения “АНК 32 для Windows версия 1.1”.

Относительные количества транскриптов гена *GSK3B* в различных группах пациентов рассчитывали по формуле $R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$ согласно методу сравнения C_p [29]. Данные анализировали с помощью непараметрического теста Манна–Уитни U, все вычисления выполнены с применением программного обеспечения Statistica v8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализировали относительную экспрессию гена *GSK3B* в трех группах пациентов и контрольной группе здоровых добровольцев. В качестве внутренних генов сравнения мы использовали гены *POLR2F*, кодирующий полипептид F второй субъединицы РНК-полимеразы, и *PSMB6*, кодирующий Y-субъединицу протеасомы, так как они являются так называемыми генами “домашнего хозяйства” и для них характерен стабильный уровень экспрессии во многих тканях организма [30]. Каждый образец крови анализировали в трех независимых повторях для коррекции разницы в эффективности реакции обратной транскрипции.

Результаты исследования относительной экспрессии гена *GSK3b* представлены на рисунке. Видно, что в крови пациентов с БП как получавших, так и не получавших лечение, практически не наблюдается изменения количества транскриптов гена *GSK3b* (медианы 1.03 и 0.91 соответственно) по сравнению с группой здоровых добровольцев.



Относительные уровни экспрессии гена *GSK3b* в группах с болезнью Паркинсона (БП) и церебральным атеросклерозом (ЦА) по сравнению с контрольной группой. БП(не леч) – пациенты, не получавшие лечения; БП(леч) – пациенты, получавшие лечение. R – относительный уровень экспрессии гена *GSK3b*. За единицу принят уровень экспрессии гена *GSK3b* в группе неврологически здоровых добровольцев.

В то же время, в крови больных с церебральным атеросклерозом обнаружено значительное уменьшение относительной экспрессии гена *GSK3b* (рисунок). При этом наблюдается уменьшение уровня мРНК гена *GSK3b* в три раза. Все результаты являются статистически значимыми (0.33, $p < 0.001$).

Праймеры и зонды, используемые в работе

Название	Последовательность
GSK3b-probe	5'-ROX-CCGGAACAGTATACAGAGTTGCCAGACAC-RTQ-2
GSK3b-f	5'-GTCTATCTTAATCTGGTGCTGGAC
GSK3b-r	5'-AGCTGATACATATACAACCTTGACATAAATC
PolR2F-probe	5'-FAM-CTTCATCCTCCTCCACATCATCAAAGTCGTCTCG-RTQ-1
PolR2F-f	5'-ATGTCAGACAACGAGGACAATTTTG
PolR2F-r	5'-TCTTCGGCATTCTCCAAGTCATC
PSMB6-probe	5'-FAM-AGCCGAGAAGTTTCCACTGGGACCACTATC-RTQ-1
PSMB6-f	5'-CGGAGGCGTTCACCTCCAG
PSMB6-r	5'-TCGATTGGCGATGTAGGACC

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время большинство современных методов диагностики БП на ранних стадиях, особенно на доклинической, не дают возможности однозначно поставить диагноз. Наиболее точными и адекватными методами выявления пресимптоматической стадии БП являются позитронно-эмиссионная томография с мечеными радиолигандами и однофотонная эмиссионная компьютерная томография [31]. Однако данные методы остаются крайне дорогими и не могут применяться при массовом скрининге. Этим обусловлены поиски новых доступных методов диагностики пресимптоматических стадий БП, в том числе, биомаркеров в крови, что позволит выявлять людей, находящихся в группе риска развития БП. Затем, уже в этой группе, можно будет проводить более дорогостоящие уточняющие исследования. Одним из таких биомаркеров, например, могут быть относительные уровни мРНК различных генов, связанных с БП, в периферической крови. Кроме того, изучение изменения экспрессии кандидатных генов, участвующих в развитии этой болезни, позволит расширить наши представления об этиопатогенезе заболевания, в том числе на ранних стадиях, когда процессы дегенерации затронули лишь небольшое число нейронов.

В данной работе мы исследовали экспрессию гена *GSK3b* в периферической крови, основываясь на данных Арментеро (Armentero) и соавт. [11], которые показали, что количество *GSK3b* в лимфоцитах периферической крови у пациентов с БП или БА увеличивается. Однако нам не удалось обнаружить никаких изменений в уровне экспрессии гена *GSK3B* у наших пациентов с БП. Этот факт мог бы объясняться тем, что мы исследовали пациентов, находящихся на более ранних стадиях заболевания, чем исследованные в упомянутой работе [11]. Большинство наших пациентов до лечения находилось на 1-ой и 2-й стадиях заболевания (по шкале Хен-Яра). Изменения количества белка *GSK3b*, наблюдаемые упомянутыми авторами, могут появляться на более поздних стадиях (2.42 стадия по этой шкале) [11]. К тому же, ранее показано, что количество обеих изоформ *GSK3* напрямую коррелирует с приемом препарата L-DOPA в течение дня у пациентов с БП и при инкубации лимфоцитов с этим же препаратом [11]. Это согласуется с результатами на крысах, больных паркинсонизмом, который индуцирован 6-гидроксидофамином [32]. В связи с этим мы исследовали также экспрессию гена *GSK3B* в крови пациентов с БП как подвергавшихся лечению, так и не подвергавшихся. Однако и здесь никаких различий в количествах транскриптов гена *GSK3B* мы не обнаружили. С другой стороны, инкубация лимфоцитов периферической крови с ингибитором холинэстеразы, бромидом пиридостигмина в разных концентрациях, не оказывает влияния ни на количество, ни на фосфорилирование *GSK3* [11].

Более того, изменения уровней экспрессии гена *GSK3B* могут быть связаны с причинами неспецифического характера, так как мы обнаружили уменьшение экспрессии гена *GSK3B* у пациентов с церебральным атеросклерозом. Эти изменения можно объяснить повреждением и гибелью нейронов вследствие нарушения кровообращения. Выбор именно этой группы сравнения объясняется тем, что патогенез церебрального атеросклероза принципиально отличается от патогенеза БП, но затрагивает, в основном, центральную нервную систему.

Таким образом, на основании наших данных можно сделать вывод о том, что уровни экспрессии гена *GSK3B* не могут служить биомаркером пресимптоматической или ранних стадий БП. При поисках маркеров в дальнейшем следует обратить внимание на уровни экспрессии других генов, вовлеченных в патогенез этой болезни, как, например, генов *SNCA*, *PARK2* и *SLC6A3*.

Работа получила финансовую поддержку Российского фонда фундаментальных исследований (07-04-01511, 07-04-00027, 09-04-01237), программ Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология”, “Фундаментальная наука медицине”, а также Государственных контрактов (02.740.11.0084, П419, П1055).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lesage S., Brice A. 2009. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum. Mol. Genet.* **18**, R48–59.
2. Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F. 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* **20**, 415–455.
3. Cookson M.R., Hardy J., Lewis P.A. 2008. Genetic Neuropathology of Parkinson's Disease. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **1**, 217–231.
4. Michell A.W., Lewis S.J.G., Foltynie T., Barker R.A. 2004. Biomarkers and Parkinson's disease. *Brain.* **127**, 1693–1705.
5. Miller D.W., Hague S.M., Clarimon J., Baptista M., Gwinn-Hardy K., Cookson M.R., Singleton A.B. 2004. Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology.* **62**, 1835–1838.
6. Sunada Y., Saito F., Matsumura K., Shimizu T. 1998. Differential expression of the parkin gene in the human brain and peripheral leukocytes. *Neurosci Lett.* **254**, 180–182.
7. Schulz J.B., Beal M.F. 1994. Mitochondrial dysfunction in movement disorders. *Curr. Opin. Neurol.* **7**, 333–339.
8. Barbanti P., Fabbrini G., Ricci A., Cerbo R., Bronzetti E., Caronti B., Calderaro C., Felici L., Stocchi F., Meco G., Amenta F., Lenzi G.L. 1999. Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* **14**, 764–771.

9. Petrozzi L., Lucetti C., Gambaccini G., Bernardini S., Del Dotto P., Migliore L., Scarpato R., Bonuccelli U. 2001. Cytogenetic analysis oxidative damage in lymphocytes of Parkinson's disease patients. *Neurol. Sci.* **22**, 83–84.
10. Scherzer C.R., Eklund A.C., Morse L.J., et al. 2007. Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 955–960.
11. Armentero M.T., Sinforiani E., Ghezzi C., et al. 2010. Peripheral expression of key regulatory kinases in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.01.004.
12. Woodgett J.R. 2004. Glycogen Synthase Kinase-3. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Vol. 2. Eds Lenarz W.J., Lane M.D. Elsevier Inc., pp. 255–260.
13. Morfini G., Szebenyi G., Elluru R., Ratner N., Brady S.T. 2002. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin-based motility. *EMBO J.* **21**, 281–293.
14. Pigino G., Morfini G., Pelsman A., Mattson M.P., Brady S.T., Busciglio J. 2003. Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. *J. Neurosci.* **23**, 4499–4508.
15. Stokin G.B., Lillo C., Falzone T.L., Brusch R.G., Rockenstein E., Mount S.L., Raman R., Davies P., Masliah E., Williams D.S., Goldstein L.S.B. 2005. Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science.* **307**, 1282–1288.
16. Shah S.B., Nolan R., Davis E., Stokin G.B., Niesman I., Canto I., Glabe C., Goldstein L.S.B. 2009. Examination of potential mechanisms of amyloid-induced defects in neuronal transport. *Neurobiol. Disease.* **36**, 1–25.
17. Jope R.S., Johnson G.V.W. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 95–102.
18. Buttrick G.J., Wakefield J.G. 2008. PI3-K and GSK-3: Akt-ing together with microtubules. *Cell Cycle.* **7**, 262–2625.
19. Duronio V. 2008. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem. J.* **415**, 333–344.
20. Ferrer I., Barrachina M., Puig B. 2002. Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in Alzheimer's disease, Pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration *Acta Neuropathol.* **104**, 583–591.
21. Hoshi M., Takashima A., Noguchi K., Murayama M., Sato M., Kondo S., Saitoh Y., Ishiguro K., Hoshino T., Imahori K. 1996. Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 2719–2723.
22. Luna-Muñoz J., García-Sierra F., Falcón V., Menéndez I., Chávez-Macias L., Mena R. 2005. Regional conformational change involving phosphorylation of tau protein at the Thr231, precedes the structural change detected by Alz-50 antibody in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Disease.* **8**, 29–41.
23. Valencia A., Reeves P.B., Sapp E., Li X., Alexander J., Kegel K.B., Chase K., Aronin N., DiFiglia M. 2009. Mutant huntingtin and glycogen synthase kinase 3- accumulate in neuronal lipid rafts of a presymptomatic knock-in mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* **88**, 179–190.
24. Ross C.A., Poirier M.A. 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature Med.* **10**, S10–S17.
25. Nagao M., Hayashi H. Glycogen synthase kinase-3beta is associated with Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **449**, 103–107.
26. Bové J., Prou D., Perier C., Przedborski S. 2005. Toxin-Induced Models of Parkinson's Disease. *NeuroRx: J. Am. Soc. Exp. NeuroTherapeutics.* **2**, 484–494.
27. Hye A., Kerr F., Archer N., Foy C., Poppe M., Brown R., Hamilton G., Powell J. 2004. Glycogen synthase kinase-3 is increased in white cells early in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **373**, 1–4.
28. Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L., Lees A.J. 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **55**, 181–184.
29. Applied Biosystems. 2001. User bulletin No 2: ABI prism 7700 sequence detection system.
30. Warrington J.A., Nair A., Mahadevappa M., Tsyganskaya M. 2000. Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. *Physiol. Genomics.* **2**, 143–147.
31. DeKosky S.T., Marek K. Looking backward to move forward: Early detection of neurodegenerative disorders. *Science.* **302**, 830–834.
32. Bychkov E., Ahmed M.R., Dalby K.N., Gurevich E.V. 2007. Dopamine depletion and subsequent treatment with L-DOPA, but not the long-lived dopamine agonist pergolide, enhances activity of the Akt pathway in the rat striatum. *J. Neurochemistry.* **102**, 699–711.