

**Е.В. Филатова¹, А.Х. Алиева¹, М.И. Шадрин¹, М.В. Шульская¹, Е.Ю. Федотова²,
С.Н. Иллариошкин², С.А. Лимборская¹, П.А. Сломинский¹**

АНАЛИЗ МУТАЦИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ПРЕДПОЛАГАЕМОЙ АУТОСОМНО-ДОМИНАНТНОЙ ФОРМОЙ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

¹Институт молекулярной генетики Российской академии наук, 123182 Москва, Россия. ²Научный центр неврологии Российской академии медицинских наук, 125367, Москва, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) – тяжелое неврологическое заболевание человека, в патогенез которого вовлечены различные генетические системы и факторы внешней среды. Однако, несмотря на активные исследования этого заболевания, причины его остаются до конца не выясненными и по-прежнему не определен точный спектр всех генов и мутаций, принимающих участие в патогенезе наследственной формы БП. Настоящая работа посвящена анализу мутаций, приводящих к развитию моногенных форм БП, у пациентов с предполагаемой аутосомно-доминантной формой БП с помощью множественной лигазной полимеразной реакции (МЛПР). Выявлены мутации (G2019S в *LRRK2*, гетерозиготные делеции 2 и 3, 3 и 4 экзонов и гетерозиготная дупликация экзонов 2-4 гена *PARK2*, делеция экзона 3 в гене *PARK7*), приводящие к развитию БП, только у 7 (18,4%) человек из 70, что говорит о необходимости дальнейшего поиска новых мутаций, например, с помощью методов экзомного секвенирования. В дальнейшем это поможет разработать молекулярно-генетические тесты для ранней доклинической диагностики и определения риска развития БП и лучше понять причины и механизмы развития этого заболевания.

Ключевые слова: *болезнь Паркинсона; мутации; множественная лигазная полимеразная реакция*

Болезнь Паркинсона (БП) – тяжелую неврологическую патологию, являющуюся одним из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний человека, в настоящее время относят к мультифакториальным заболеваниям, в патогенез которых вовлечены различные генетические системы и факторы внешней среды. В основе неуклонно прогрессирующего течения БП лежит гибель дофаминергических нейронов компактной части черной субстанции головного мозга, однако истинные причины развития БП в настоящее время остаются до конца невыясненными [1]. В настоящее время считают, что для большинства больных характерно спорадическое развитие заболевания, и только в 10–15% случаев оно наследуется по моногенному аутосомному типу. На данный момент в 7 генах моногенных форм БП (*SNCA*, *PARK2*, *LRRK2*, *PARK7*, *PINK1*, *UCHL1*, *ATP13A2*) обнаружено около двух сотен различных мутаций, приводящих к развитию заболевания [2, 3]. Однако даже такое большое количество выявленных мутаций не способно объяснить все случаи наследственных и тем более спорадических форм БП. По-прежнему остается открытым вопрос о том, какой вклад вносят в патогенез спорадической формы БП гены семейных форм заболевания и другие генетические факторы.

Настоящая работа посвящена анализу мутаций, приводящих к развитию моногенных форм БП, у пациентов с предполагаемой аутосомно-доминантной формой БП с помощью множественной лигазной полимеразной реакции (МЛПР). Данная работа в дальнейшем позволит разработать методы отбора пациентов для более детального и эффективного (но дорогостоящего)

поиска и анализа новых мутаций и генов – экзомного секвенирования. Это позволит уточнить спектр генетических причин развития семейных форм БП в российской популяции, а также выявить ранее неизвестные мутации, приводящие к формированию аутосомно-доминантной формы БП. Дальнейший анализ мутаций в генах, вовлеченных в патогенез БП, позволит разработать молекулярно-генетические тесты для ранней доклинической диагностики и определения риска развития БП, а кроме того, лучше понять причины и механизмы развития этого заболевания.

Материалы и методы

В настоящей работе было исследовано 70 пробандов, у которых на основании семейного анамнеза диагностировали БП с высокой вероятностью аутосомно-доминантного типа наследования. Все пациенты с БП были русскими по происхождению из Москвы. Пациенты были отобраны и исследованы по международной унифицированной оценочной шкале БП (Unified Parkinson's Disease Rating Scale – UPDRS) и шкале Хен и Яра (Hoehn and Yahr scores) [4, 5] в Научном центре неврологии Российской академии медицинских наук (Москва). Средний возраст пациентов составил 53,2±6,8 (47–60) года, среднее значение ± стандартное отклонение (диапазон), соотношение по полу: мужчины/ женщины 16/22. Все образцы крови были взяты с информированного согласия исследуемых лиц. Настоящее исследование было одобрено Этическим комитетом Научного центра неврологии Российской академии медицинских наук (Москва).

Выделение геномной ДНК из лейкоцитов проводили с использованием набора AxyPrepBlood Genomic DNA MiniPrep Kit («Axygen», США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию выделенных нуклеиновых кислот измеряли с помощью набора Quant-iT RNA BR Assay Kit и флуориметра Qubit («Invitrogen», США) согласно рекомендациям производителя.

Подготовку образцов ДНК пациентов с БП для проведения фрагментного анализа проводили методом МЛПР с использованием наборов зондов P051-50 (lot C2-0911) и P052-50 (lot C1-0809) для диагностики БП и набора реагентов EK1-FAM для МЛПР SALSA MLPA («MRC-Holland b.v.», Нидерланды) согласно рекомендациям производителя.

Капиллярный электрофорез проводили на приборе ABI-Prism 3100 («Applied Biosystems», США) с использованием капилляра длиной 36 см и полимера POP-4 согласно рекомендациям производителя. В качестве маркера был использован размерный стандарт GeneScan™ – 600 LIZ® Size Standard («Applied Biosystems», США).

Первичную обработку полученных данных, сопоставление полученных пиков с информацией о них в наборе праймеров и зондов на мутации и полиморфизмы, а также фрагментный анализ проводили с использованием программного обеспечения Coffalyser.Net («MRC-Holland», Нидерланды).

Результаты и обсуждение

В ходе работы у 7 (18,4%) пациентов были найдены различные мутации, приводящие к развитию моногенных форм БП.

В 3 (8%) случаях обнаружена точковая мутация G2019S в гене дардарина *LRRK2* (что подтверждает ра-

нее полученные данные о высокой частоте этой мутации у пациентов с аутосомно-доминантной формой БП в различных этнических группах) [6]. В российской популяции эта мутация обнаружена как у больных из семей с аутосомно-доминантной формой БП (с частотой 13%), так и у больных спорадической формой БП (частота 0,5%) в европейской части России [7], а также в 7% случаев семейной формы заболевания и в 0,8% – спорадической в Северо-Западном регионе России [8].

У трех больных выявлены различные перестройки экзонов гена паркина *PARK2*, причем обнаружены как гетерозиготные делеции экзонов 2 и 3 и 3 и 4 этого гена (у двух пациентов), так и гетерозиготная дупликация 2-4 экзонов гена (у одного пациента). Интересно, что во всех трех случаях перестройки захватывали экзоны 3 и 4, которые ранее нами были определены как «горячие точки» при перестройках гена *PARK2* при БП [9]. Необходимо отметить, что в некоторых случаях гетерозиготные делеции в гене *PARK2* могут проявляться как доминантные мутации и приводить к поздней форме заболевания [10, 11]. В то же время гомозиготность по мутации в этом гене вызывает раннюю аутосомно-рецессивную форму БП с медленным прогрессированием патологического процесса. Кроме того, гетерозиготные мутации с изменением копийности экзонов гена паркина повышают риск развития спорадической формы заболевания [3, 9], однако эти перестройки выявляются менее чем у 10% пациентов.

Нам также удалось выявить у одного из пациентов гетерозиготную делецию экзона 3 в гене *PARK7*. Ранее было показано, что перестройки в гене *PARK7* приводят к развитию редких форм аутосомно-рецессивной БП с ранним началом развития заболевания [12]. Таким образом, данного рода мутации в гене *PARK7* при аутосомно-доминантном типе наследования по клинической картине были выявлены нами впервые.

Наша работа подтвердила генетическую микрогетерогенность БП [3]: выявленные мутации весьма разнообразны и встречаются редко, что подтверждает неоднородность данного заболевания. В целом, с помощью МЛПР нам удалось выявить мутации (G2019S в *LRRK2*, гетерозиготные делеции экзонов 2 и 3, 3 и 4 и гетерозиготная дупликация экзонов 2-4 гена *PARK2*, делеция экзона 3 в гене *PARK7*), приводящие к развитию БП, только у 7 (18,4%) человек, что говорит о необходимости дальнейшего поиска новых мутаций, например, с помощью методов экзомного секвенирования. Однако в силу высокой стоимости секвенирования важно предварительно тщательно отбирать пациентов с неизвестной генетической причиной БП. В связи с этим первичный анализ с помощью МЛПР больных с семейной формой БП необходим с целью снижения затрат и повышения эффективности поиска новых мутаций и генетических маркеров риска развития БП.

Таким образом, проведение исследований, направленных на идентификацию новых генетических маркеров, даст возможность выявить новые молекулярные механизмы развития болезни Паркинсона и даже функционирования нервной системы в целом, что позволит начать разработку новых патогенетически обусловленных методов лечения многих нейродегенеративных заболеваний.

Работа получила финансовую поддержку Государственного контракта № 14.512.11.0043, Государственных контрактов (16.740.11.0630 и 8851), а также программ Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».

ЛИТЕРАТУРА

1. Tolleson C.M., Fang J.Y. Advances in the mechanisms of Parkinson's disease. *Discov Med.* 2013; 80: 61–6.
2. Ungerstedt U., Ljungberg T., Steg G. Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine neurons. *Adv. Neurol.* 1974; 421–6.
3. Nussbaum R.L., Polymeropoulos M.H. Genetics of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 1997; 10: 1687–91.
4. Goetz C.G., Poewe W., Rascol O., Sampaio C., Stebbins G.T., Counsell C. et al. Movement Disorder Society Task Force Report on the Hoehn and Yahr Staging Scale: Status and Recommendations. *Mov. Disord.* 2004; 9: 1020–8.
5. Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L., Lees A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1992; 181–4.
6. Cookson M.R. The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2010; 12: 791–7.
7. Illarionovskiy S.N., Shadrina M.I., Slominsky P.A., Beshpalova E.V., Zagorovskaya T.B., Bagyeva G. et al. *Eur. J. Neurol.* 2007; 4: 413–7.
8. Wirdefeldt K., Adami H.-O., Cole P. et al. *Eur. J. Epidemiol.* 2011; 1: 1–58.
9. Semenova E.V., Shadrina M.I., Slominsky P.A., Ivanova-Smolenskaya I.A., Bagyeva G., Illarionovskiy S.N., Limborska S.A. *Mov. Disord.* 2012; 1; p. 139–42.
10. Blandini F., Armentero M.T. Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J.* 2012; 7: 1156–66.
11. Na S.J., Di Lella A.G., Lis E.V., Jones K., Levine D.M., Stone D.J., Hess J.F. *Neurochem. Res.* 2010; 5: 761–72.
12. Pankratz N., Pauciulo M.W., Elsaesser V.E., Marek D.K., Halter C.A., Wojcieszek J. et al. *Neurosci. Lett.* 2006; 3: 209–13.

Поступила 15.09.13

ANALYSIS OF MUTATIONS IN PATIENTS WITH SUSPECTED AUTOSOMAL DOMINANT FORM OF THE PARKINSON DISEASE

E. V. Filatova¹, A. Kh. Alieva¹, M. I. Shadrina¹, M. V. Shulskaya¹, E. Yu. Fedotova², S. N. Illarionovskiy², S. A. Limborska¹, and P. A. Slominsky¹

¹Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; ²Scientific Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

The Parkinson disease (PD) is a severe neurological disorder. Diverse genetic systems and environmental factors are involved in the pathogenesis of this disease. However, despite extensive research into the disease, its causes are not fully elucidated, and the exact spectrum of genes and mutations involved in the development of hereditary forms of PD has not been fully clarified yet. The present work is devoted to the analysis of mutations that lead to the development of monogenic forms of PD in patients with suspected autosomal dominant form of PD using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). We have identified several mutations (G2019S in *LRRK2*, heterozygous deletions of 2-3, 3-4 exons and heterozygous duplication of 2-4 exons in *PARK2*, deletion of 3 exon in *PARK7*) that lead to the development of PD in only 7 people out of 70 (18.4%), which suggests the need for further search of new mutations, for example, using exome sequencing. In the future it will help to develop the molecular genetic tests for early preclinical diagnosis and risk evaluation of the development of PD, and to understand better the causes and mechanisms of this disease.

Key words: Parkinson disease; mutations; multiplex ligation-dependent probe amplification