

Гетерогенность спорадической болезни Паркинсона: молекулярный подход к решению проблемы

С.Н. Иллариошкин¹, П.А. Сломинский², М.И. Шадрина², Г.Х. Багыева¹, Т.Б. Загоровская¹, Е.Д. Маркова¹,
А.В. Карабанов¹, В.В. Полещук¹, Е.В. Полевая¹, Н.В. Федорова³, С.А. Лимборская², И.А. Иванова-Смоленская¹

¹НИИ неврологии РАМН, г. Москва

²Институт молекулярной генетики РАН, г. Москва

³Российская медицинская академия последиplomного образования, г. Москва

Проведен поиск мутаций в генах PRKN (паркин), LRRK2 и SNCA (а-синуклеин) у 359 пациентов славянского этнического происхождения (169 мужчин и 190 женщин) с болезнью Паркинсона, из которых 345 представляли спорадические случаи. Возраст манифестации симптомов составил от 23 до 84 лет, пациенты с ювенильным паркинсонизмом (дебют симптомов до 20 лет) исключались из набора. При исследовании мажорной мутации G2019S в гене LRRK2, а также структурных перестроек в генах PRKN и SNCA было установлено, что при болезни Паркинсона частота изучаемых мутаций составляет 7,5% (27 больных из 359). Мутация LRRK2-G2019S выявлена у 1,1% больных, экзонные перестройки в паркине — у 5,8% (в том числе у 10,7% больных с ранней формой болезни Паркинсона и у 1,7% пациентов с поздней формой болезни), дупликация гена SNCA — у 2 больных. Проведенный анализ показал выраженную гетерогенность молекулярной структуры болезни Паркинсона в российской популяции, что позволяет считать данное заболевание не единой нозологической формой, а совокупностью самостоятельных (хотя и сходных) нейродегенеративных синдромов. Идентификация наследуемых мутаций в части спорадических случаев болезни Паркинсона существенно меняет семейный прогноз и требует проведения медико-генетического консультирования у лиц из группы высокого риска.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, спорадические случаи, мутационный анализ, генетическая гетерогенность, медико-генетическое консультирование.

Блезнь Паркинсона — прогрессирующее возраст-зависимое нейродегенеративное заболевание, распространенность которого в общей популяции варьирует от 100 до 350 на 100 000 населения, будучи наиболее высокой в группе пациентов пожилого возраста (1–2% среди лиц старше 65 лет) [5, 7].

Этиология болезни Паркинсона остается предметом дискуссий, однако наиболее обоснованной на сегодняшний день признается точка зрения о мультифакторной модели развития заболевания, имеющей как экзогенную, так и эндогенную составляющую [4]. Согласно современным представлениям, в развитии болезни Паркинсона имеет значение специфическое взаимодействие генетических и средовых факторов, определяющих особенности клеточной детоксикации и обмена ксенобиотиков, антиоксидантной за-

щиты, митохондриальных реакций, процессинга ряда нейрональных белков, дофаминового обмена [3, 37].

В противоположность доминировавшей на протяжении многих десятилетий точке зрения о «негенетической» природе болезни Паркинсона в настоящее время роль генетики в развитии заболевания подтверждается многочисленными исследованиями, проведенными с использованием различных методических подходов. Во-первых, показано, что для паркинсонизма имеется четкая тенденция к внутрисемейному накоплению случаев заболевания, а ближайшие родственники больных имеют в 2–7 раз более высокий риск развития болезни Паркинсона по сравнению с общепопуляционным [9]. Такое семейное накопление особенно характерно для ранних (до 40 лет) случаев болезни Паркинсона [15]. Во-вторых, благодаря применению новейших

изотопных методов нейровизуализации – ОФЭКТ и ПЭТ, – позволяющих верифицировать пресимптоматическую дисфункцию nigrostriарной дофаминергической системы у клинически здоровых братьев и сестер, произошел пересмотр результатов близнецовых исследований и была установлена значительно более высокая конкордантность по болезни Паркинсона среди монозиготных близнецовых пар (55%) по сравнению с дизиготными (18%) [34]. Интересно отметить, что различия в конкордантности также наиболее заметны у молодых больных, что подчеркивает особую роль генетики в развитии раннего паркинсонизма [38]. В-третьих, результаты анализа генетических ассоциаций показали определенную роль в развитии болезни Паркинсона «аллелей риска» ряда кандидатных генов, имеющих значение в функционировании нигральных нейронов (следует отметить при этом, что вклад каждого из изученных полиморфизмов в формирование предрасположенности к болезни Паркинсона сравнительно невелик) [36].

Несомненно, важнейшее значение в раскрытии генетических основ болезни Паркинсона сыграло выявление родословных с четким менделевским наследованием болезни [39]. Именно благодаря молекулярному исследованию таких репрезентативных семей оказалось возможным клонирование соответствующих мутантных генов и установление их белковых продуктов.

На конец 2006 г. идентифицировано как минимум 11 хромосомных локусов и 7 самостоятельных генов, ответственных за развитие менделирующих форм болезни Паркинсона, в том числе 4 гена для аутосомно-доминантных и 3 – для аутосомно-рецессивных вариантов болезни [4, 32, 39, 43]. И хотя наследственно-семейные случаи составляют не более 5–10% от общего числа случаев болезни Паркинсона, именно эти редкие моногенные варианты стали ценными «моделями», позволившими раскрыть молекулярные звенья патогенеза первичного паркинсонизма. Так, благодаря анализу уникальной PARK1-формы болезни, локус которой картирован на хромосоме 4q21–23, была установлена роль белка α -синуклеина как основного компонента телец Леви и ключевого молекулярного маркера патологии нейронов при развитии нейродегенерации паркинсоновского типа [16]. Сложилась современная представления об универсальном значении изменений нативной конформации α -синуклеина (под влиянием наследуемых мутаций либо экзогенных нейротоксических факторов) в патогенезе семейных и спорадических случаев болезни Паркинсона [3, 30]. Показательно в связи с этим, что основным типом мутаций при PARK1-форме болезни Паркинсона являются полные дупликации и трипликации гена α -синуклеина (*SNCA*), т.е. дефекты, ведущие к повышению экспрессии (гиперпродукции) белка и его патологической агрегации в клетке [35]. Более того, на экспрессию α -синуклеина могут влиять также полиморфизмы в регуляторной области гена, что является одним из механизмов генетической предрасположенности к развитию спорадической болезни Паркинсона [23].

«Конформационная» теория нашла дальнейшее подтверждение благодаря идентификации других генов, мутации

которых при паркинсонизме сопровождаются нарушением белкового гомеостаза в нейронах. К ним относятся гены белка паркина (локус *PARK2* на хромосоме 6q25–27 – обозначение гена *PRKN*) и убиквитин-С-концевой гидролазы (локус *PARK5* на хромосоме 4p14), продукты которых являются ключевыми компонентами протеолитической убиквитин-протеасомной системы клетки [22, 24]. Совсем недавно был идентифицирован еще один ген – *LRRK2*, ответственный за развитие аутосомно-доминантных случаев болезни Паркинсона, сцепленных с локусом *PARK8* на хромосоме 12q12 [32, 43]. Соответствующий белок дардарин является цитоплазматической ГТФ-зависимой киназой, предположительно вовлеченной в процессинг нейрональных белков [12].

Таким образом, семейная болезнь Паркинсона характеризуется чрезвычайной генетической гетерогенностью. При этом в семьях с четким аутосомно-рецессивным наследованием наиболее высок удельный вес мутаций гена *PRKN* (паркин) – более 50% случаев с ранним началом [26, 29], а при аутосомно-доминантной болезни Паркинсона чаще всего встречаются мутации в гене *LRRK2* – от 2 до 13% семей [8, 12, 14].

Наименее изученным остается вопрос о роли всех указанных генов в развитии спорадической болезни Паркинсона. Основные исследования в данном направлении касались гена *PRKN*. Известно, что при отсутствии семейного анамнеза частота выявления гомозиготных мутаций *PRKN* зависит от возраста начала болезни: при юношеском спорадическом паркинсонизме они обнаруживаются у 15–18% больных и значительно реже – у пациентов с дебютом в 25–40 лет [1, 26, 29]. Гомозиготность по мутациям *PRKN* описана даже у отдельных больных с «классическим» поздним фенотипом болезни Паркинсона и отсутствием семейного анамнеза [21, 27], но это скорее казуистика, демонст-

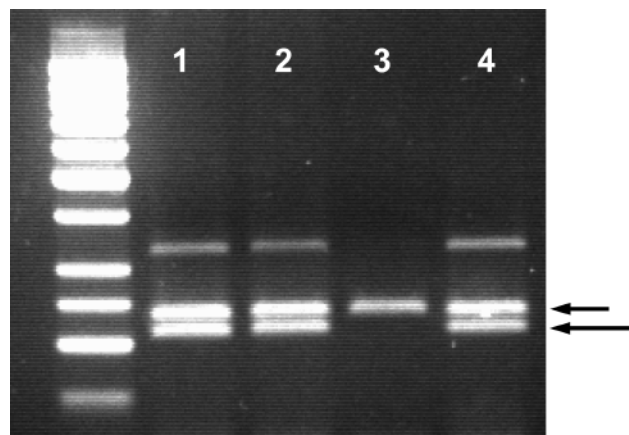


рис. 1: Идентификация мутации G2019S в гене *LRRK2*
 короткой стрелкой указан нормальный SfiI-рестрикционный фрагмент размером 228 пар оснований, длинной стрелкой – мутантный фрагмент размером 207 пар оснований (мутация G2019S);
 дорожки 1, 2 и 4 – носители гетерозиготной мутации G2019S в гене *LRRK2*, дорожка 3 – норма

рирующая необычайно широкую вариабельность PARK2-формы аутосомно-рецессивного паркинсонизма.

В последние годы традиционные представления о генетике паркинкопатий как аутосомно-рецессивных форм патологии претерпели значительные изменения. Появились сообщения о случаях паркинсонизма, при которых интенсивный молекулярный скрининг смог выявить мутацию *PRKN* лишь в одном из двух аллелей гена [21, 40]. Наши собственные данные, полученные ранее при молекулярно-генетическом анализе российских семей с ювенильным паркинсонизмом, показали отсутствие второй мутации *PRKN* у 44,4% больных с подтвержденным ДНК-диагнозом паркинкопатии [1]. Была высказана гипотеза, что носительство мутации *PRKN* даже на одной хромосоме иногда может сопровождаться развитием доминантной формы болезни — наиболее вероятно, по механизму гаплонедостаточности [40]. Патогенетическая роль паркин-гетерозиготности подтвердилась с помощью ПЭТ: Hilker et al. в 2001 г. при обследовании асимптомного пациента, имеющего мутантный и нормальный аллель *PRKN*, выявили отчетливое снижение захвата флюородопы в стриатуме [18], что является четким нейровизуализационным свидетельством субклинической дофаминергической дисфункции. Так было установлено, что гаплонедостаточность по гену *PRKN* действительно может определять гибель дофаминовых нейронов и быть зна-

чимым фактором генетической предрасположенности к развитию первичного паркинсонизма.

В дальнейшем была проведена серия работ, посвященных анализу ассоциаций между болезнью Паркинсона и гетерозиготным носительством мутаций в гене *PRKN*. Мета-анализ результатов этих исследований, проведенный Европейским консорциумом по болезни Паркинсона, подтвердил, что наличие единственной гетерозиготной мутации в *PRKN* является фактором риска спорадической болезни Паркинсона [12, 40].

Не меньшее значение в развитии болезни Паркинсона в общей популяции имеет ген *LRRK2*. Это стало понятным в последние два года, когда мутационный скрининг невыборочных серий больных с «классической» спорадической болезнью Паркинсона выявил те или иные мутации *LRRK2* у 0,4–2,7% всех обследованных пациентов [6, 11, 14, 28, 33, 42]. В некоторых популяциях частота отдельных мутаций *LRRK2* может быть существенно выше в связи с эффектом основателя, как это имеет место, например, в северной Африке. В данном регионе частота мажорной мутации *LRRK2*-G2019S составляет: у арабов — 40,8% в спорадических и 37,0% в семейных случаях болезни Паркинсона, а у евреев ашкенази — 13,3% в спорадических и 29,7% в семейных случаях болезни [25, 31].

таблица 1: Выявленные структурные перестройки в гене *PRKN* у пациентов с ранней болезнью Паркинсона

Возраст манифестации симптомов (годы)	Экзоны гена <i>PRKN</i>											
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
28												
25												
31												
28												
35												
39												
36												
23												
26												
30												
40												
23												
45												
24												
40												

 гетерозиготная делеция
 гетерозиготная дупликация

таблица 2: Выявленные структурные перестройки в гене *PRKN* у пациентов с поздней болезнью Паркинсона

Возраст манифестации симптомов (годы)	Экзоны гена <i>PRKN</i>										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
46											
68											
50											
61											
66											
67											

 гетерозиготная делеция

 гомозиготная делеция

Значительно меньше данных о частоте мутаций в других локусах (*PARK1*, *PARK6*, *PARK7*) при спорадической болезни Паркинсона.

Таким образом, на сегодняшний день весьма актуальным и практически важным является молекулярный скрининг различных каузативных генов в общей группе больных болезнью Паркинсона. В настоящей работе нами представлены первые в России результаты такого систематического мутационного анализа трех генов – *PRKN*, *LRRK2* и *SNCA* – в большой группе больных-славян со спорадической формой болезни Паркинсона.

Характеристика больных и методов исследования

Отбор больных с первичным паркинсонизмом

В исследование было включено 359 пациентов (169 мужчин и 190 женщин) с различными клиническими вариантами первичного паркинсонизма. У 345 больных имел место отрицательный семейный анамнез по болезни Паркинсона (спорадические случаи). Лишь у 14 (3,9%) пациентов имелись указания на достоверное или вероятное аутосомно-доминантное наследование болезни Паркинсона (в каждой семье имелись как минимум 2 больных из 2 последовательных поколений родословной); клиничко-генетические особенности большинства из этих семейных случаев болезни Паркинсона были описаны нами ранее [2]. Аутосомно-доминантный паркинсонизм рассматривался нами в качестве своеобразной группы сравнения по отношению к основной обследованной группе – спорадической болезни Паркинсона.

Большинство пациентов в соответствии с собранными сведениями имели славянские этнические корни по одной либо обоим родительским линиям и происходили из семей, проживавших на протяжении 2–3 поколений на территории европейской части России. В исследование не включали

лись лица с ювенильным паркинсонизмом, заболевшие на первом-втором десятилетии жизни и имевшие *a priori* генетическую составляющую в качестве ведущего фактора развития болезни [1, 4, 27].

Таким образом, нами обследована сплошная невыборочная серия преимущественно спорадических случаев болезни Паркинсона, наблюдавшихся в нейрогенетическом отделении Института неврологии РАМН за последние 4 года и соответствующих общепринятыми критериям данного заболевания [19].

Исходя из задач работы, все случаи были подразделены на две большие группы:

- 1) болезнь Паркинсона с ранним началом – манифестация первых симптомов в возрасте от 23 до 45 лет (средний возраст начала болезни $34,4 \pm 11,2$ года), всего 62 мужчины и 78 женщин;
- 2) «классическая» болезнь Паркинсона с более поздним дебютом симптомов – от 46 до 84 лет ($59,6 \pm 13,3$), всего 107 мужчин и 112 женщин.

В целом по группе средний возраст больных составил $56,9 \pm 16,8$ года, средний возраст начала болезни – $48,8 \pm 15,9$ года.

В качестве контроля обследованы 350 неврологически здоровых лиц (700 контрольных хромосом), соответствующих основной группе по возрастному и половому составу.

Молекулярно-генетический анализ

Выделение геномной ДНК производилось из 5–10 мл свежей или замороженной венозной крови стандартными методами.

Анализ мутации G2019S в гене *LRRK2*

Наиболее частой мажорной мутацией в гене *LRRK2* является нуклеотидная замена 6055G>A в 41-м экзоне *LRRK2*, ведущая к замещению глицина (G) на серин (S) в белковой позиции 2019 [14]. В связи с этим нами был проведен скрининг обследованных больных на носительство данной мутации. Детекция нуклеотидной замены 6055G>T в 41-м экзоне гена *LRRK2* (мутация G2019S) осуществлялась с использованием праймеров и зонда для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени (*real-time PCR*) в соответствии с описанным Kachergus et al. протоколом. ПЦР выполнялась в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10–20 нг геномной ДНК, 1 х ПЦР буфер (Syntol, Москва), 2,5 мМ MgCl₂, 10 пМ каждого праймера, 200 мкМ каждого из набора дезоксинуклеотидтрифосфатов, 1,25 ед. Hot-rescue Taq ДНК-полимеразы (Syntol, Москва), а также 4 пМ зонда, синтезированного на основе TaqMan-химии (Syntol, Москва). Амплификация проводилась по следующему протоколу: 2 мин при 50 °С, 10 мин при 95 °С и далее 40 циклов по 15 с при 95 °С и 50 с при 60 °С. Интенсивность флуоресценции ПЦР-продуктов оценивалась на приборе ANA-32 (Syntol, Москва). В части случаев болезни Паркинсона анализ мутации *LRRK2*-G2019S осуществлялся с помощью стандартного сайт-специфичного *SfeI*-рестрикционного теста [17]; данным тестом, в частности, подтверждался факт замены 6055G>A во всех случаях предполагаемого носительства мутации, выявленных с помощью ПЦР в реальном времени.

Анализ структурных перестроек в гене *PRKN*

В гене *PRKN* описано большое разнообразие типов мутаций, включая как точковые мутации, так и более сложные генные перестройки — экзонные и мультиэкзонные делеции, дупликации и трипликации [22, 26, 27, 40]. Во многих популяциях мира, в том числе (согласно нашим предварительным данным) и в России, делеции и мультипликации *PRKN* являются преобладающим типом мутаций [1], что определяет необходимость использования особых методов мутационного скрининга, ориентированных в первую очередь на количественный анализ ДНК и определение дозы гена у компаунд-гетерозигот [26].

У обследованных больных нами проводился поиск гетерозиготных структурных перестроек в гене *PRKN* и количественный анализ дозы гена с использованием метода ПЦР в реальном времени на приборе ANA-32 (Syntol, Москва). Структура праймеров, синтезированных для амплификации 2–12 экзонов *PRKN*, была определена с помощью программы Vector NTI Suite 9 software. В качестве внутреннего стандарта с каждым экзоном *PRKN* ко-амплифицировался ген *бета-глобина*. ПЦР проводилась в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10–20 нг геномной ДНК, 1 х ПЦР буфера (Syntol, Россия), 2,5 мМ MgCl₂, 10 пМ каждого из пары праймеров соответствующего экзона *PRKN* и *β-глобина*, 200 мкМ каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов, 1,25 ед. Hot-rescue Taq ДНК-полимеразы (Syntol, Россия) и 4 пМ зондов на отдельные экзоны генов *PRKN* и *β-глобина*, сконструиро-

ванных с использованием TaqMan-химии (Syntol, Россия). Амплификация проводилась в соответствии со следующим протоколом: 2 мин при 50 °С, 10 мин при 95 °С и 40 циклов по 15 с при 95 °С и 50 с при соответствующей отжигу температуре. Для максимальной верификации оценки интенсивности флуоресценции ПЦР-продуктов все образцы тестировались трижды.

Отношение концентраций *паркин/бета-глобин* подсчитывалось для всех ДНК-образцов. Нормальным расценивалось соотношение от 0,7 до 1,3. Показатели ниже 0,6 или выше 1,4 расценивались как гетерозиготная делеция или дупликация определенного экзона соответственно.

Количественный анализ гена *α-синуклеина (SNCA)*

С учетом особенностей фенотипических проявлений *α-синуклеинопатий* и редкости мутаций в нем по данным, полученным в ряде исследованных популяций Европы и Северной Америки [16], мы ограничили анализ гена *SNCA* группой пациентов с ранней и семейной формой болезни Паркинсона.

До настоящего времени описаны лишь 3 точковые мутации в гене *SNCA* при болезни Паркинсона, и наши собственные данные свидетельствуют об отсутствии точковых мутаций *SNCA* даже в семейных случаях болезни [20]. В то же время в последние годы было показано, что более распространенным мутационным повреждением *SNCA* при болезни Паркинсона являются полные дупликации и трипликации гена [35]. Нами впервые в России для выявления изменений копийности гена *SNCA* или отдельных его экзонов разработаны методы, основанные на использовании двух вариантов ПЦР в реальном времени — TaqMan (амплификация с использованием немеченых праймеров в присутствии флуоресцентно меченного экзон-специфичного зонда) и FRET (флуоресцентный резонансный перенос энергии, амплификация с двумя праймерами, несущими на себе флуоресцентный краситель и гаситель флуоресценции).

Результаты

Среди 359 больных с болезнью Паркинсона нами были выявлены 4 случая гетерозиготного носительства мутации G2019S в гене *LRRK2* (рис. 1), в том числе 3 случая спорадических и один — из семьи с четким аутосомно-доминантным наследованием болезни. Суммарная частота данной мутации составила, таким образом, 1,1% в общей группе обследованных пациентов с болезнью Паркинсона.

В контрольной группе (клинически здоровые лица из общей популяции) мутация G2019S в гене *LRRK2* не обнаружена.

У всех G2019S-позитивных пациентов имел место типичный фенотип болезни Паркинсона, включавший леводопачувствительный паркинсонизм с асимметричным началом симптомов и вариабельной комбинацией брадикинезии, ригидности и тремора покоя. Реже наблюдались постуральная неустойчивость, дистония и (в единственном случае) —

леводопа-индуцированные дискинезии; когнитивные и вегетативные расстройства отсутствовали. Яркой особенностью данной подгруппы явилась выраженная вариабельность значений возраста начала болезни: так, у обследованных носителей мутации *LRRK2-G2019S* первые симптомы паркинсонизма манифестировали в 29, 39, 52 и 57 лет, а в единственном семейном случае с выявленной мутацией у матери пробанда болезнь началась еще позднее — в 71 год. Интересно отметить, что в этой же семье у всех больных родственников выраженным и ранним симптомом болезни был постуральный тремор.

При количественном анализе гена *PRKN* (паркина) у 140 пациентов с ранней болезнью Паркинсона нами в 15 случаях (10,7% от общего числа больных с ранним началом) были выявлены различные структурные перестройки в *PRKN*. Все перестройки были гетерозиготными (табл. 1). В их числе: делеции отдельных экзонов (изолированных или примыкающих друг к другу) — 9 случаев; дубликации отдельных экзонов — 3 случая; сочетание делеций и дубликаций или сочетания удаленных разноэкзонных делеций — 3 случая.

При поздней болезни Паркинсона структурные перестройки гена *PRKN* были выявлены нами у 6 больных, т.е. в 1,7% случаев болезни с началом после 45 лет (табл. 2). В их числе: гомозиготная делеция экзона — 1 случай; гетерозиготные делеции отдельных экзонов — 4 случая; гетерозиготная делеция трех экзонов (с межэкзонным разрывом) — 1 случай.

Таким образом, суммарная частота выявления мутаций гена *PRKN* в общей группе пациентов с болезнью Паркинсона составила 5,8% (21 случай из 359).

В контрольной группе ни у кого из обследованных лиц делеций либо мультипликаций в *PRKN* не выявлено.

Нами было проведено сопоставление клинических особенностей заболевания в паркин-позитивных и паркин-негативных случаях болезни Паркинсона. Единственным существенным различием между группами стал возраст манифестации заболевания — более ранний при носительстве мутаций: так, у больных с выявленными мутациями в *PRKN* возраст начала заболевания варьировал от 23 до 68 лет (средний возраст $39,6 \pm 15,1$ года), а в группе больных без структурных перестроек в *PRKN* — от 24 до 84 лет ($54,4 \pm 14,2$ года), различия статистически значимы. Каких-либо других фенотипических различий между сопоставляемыми подгруппами больных отмечено не было. Клиническая картина заболевания в обеих группах больных соответствовала изолированному леводопа-чувствительному паркинсоновскому синдрому (брадикинезия, мышечная ригидность, тремор покоя, постуральная неустойчивость), в ряде случаев сочетающемуся с дистонией и леводопа-индуцированными дискинезиями.

У 2 пациентов с семейной формой болезни Паркинсона нами была выявлена дубликация гена *SNCA*. Заболевание у пробандов манифестировало в 57 и 49 лет. Клиническая картина соответствовала типичной дрожательно-ригидной форме паркинсонизма. Интересно отметить, что у сына од-

ного из больных в возрасте 13 лет появилось и стало нарастать дрожание рук, усиливающееся при волнении и физической нагрузке; осмотрен в возрасте 16 лет, диагностирован классический фенотип эссенциального тремора.

Обсуждение

Проведенное исследование впервые позволило оценить молекулярную структуру болезни Паркинсона в российской популяции, преимущественно у больных славянского этнического происхождения.

Нами показано, что в невыборочной серии спорадических случаев болезни Паркинсона частота наследуемых мутаций в 3 основных «паркинсонических» генах — *SNCA* (PARK1), *PRKN* (PARK2) и *LRRK2* (PARK8) составляет 7,5% (те или иные мутации выявлены у 27 больных из 359). Отметим, что эта частота явно занижена, поскольку по техническим причинам мы ограничились лишь исследованием наиболее значимых или наиболее типичных мутаций, не предпринимая тотального мутационного скрининга. Так, у больных была исследована лишь одна мажорная мутация в гене *LRRK2* (исследование всех 40 экзонов гена *LRRK2* представляет собой крайне сложную самостоятельную задачу), а для гена *PRKN* в данной работе ставилась задача скрининга типичных для локуса PARK2 структурных перестроек (без детального поиска точковых мутаций). С учетом возможной частоты других мутаций в исследованных генах общая распространенность форм PARK1, PARK2 и PARK8 среди спорадических случаев болезни Паркинсона может, по-видимому, достигать 10–12% [12, 40]. Иными словами, как минимум каждый десятый случай болезни Паркинсона может иметь прямую генетическую основу.

В нашей серии частота мутации G2019S в гене *LRRK2* составила 1,1%, что вполне соответствует средним показателям частоты PARK8-формы болезни Паркинсона и связанной с ней наиболее распространенной мутации в большинстве исследованных популяций [8, 11, 14, 28, 42].

Весьма значимыми являются и мутации в гене *PRKN*. Те или иные структурные перестройки (делеции, дубликации) выявлены у 5,8% больных, причем значительно чаще при ранней болезни Паркинсона (10,7%), чем при поздней форме заболевания (1,7%). Следует подчеркнуть, что в настоящей работе не анализировались случаи ювенильного паркинсонизма (дебют симптомов до 20 лет), для которого характерна еще более высокая частота повреждений гена *PRKN* [1, 26, 29]. При этом ювенильный паркинсонизм — аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное носительством двух мутантных по *PRKN* хромосом [27]. В нашем же материале при классической спорадической болезни Паркинсона обычно выявлялись гетерозиготные структурные перестройки гена, и лишь у 1 пациента (см. табл. 2) при дебюте болезни в 61 год была выявлена гомозиготная делеция 3-го экзона. Данный пациент представляет собой пример аутосомно-рецессивного PARK2-паркинсонизма, но отнюдь не ювенильного, а развившегося уже в пожилом возрасте. Таким образом, клинический спектр паркинопатий значительно шире, чем это предполагалось ранее.

Результаты проведенной работы, показывающие сравнительно высокую частоту гетерозиготных делеций и дупликаций в локусе *PARK2*, в определенной степени подтверждают обсуждаемую в литературе точку зрения о возможности доминантного эффекта мутаций гена *PRKN* [17, 18]. Предполагается, что гетерозиготное носительство мутаций в *PRKN* может быть либо каузативным само по себе, либо служить одним из значимых факторов риска развития болезни Паркинсона [13, 27]. В то же время нельзя исключить, что у части обследованных нами больных имеются какие-либо дополнительные генетические дефекты (например, «неблагоприятные» полиморфизмы или неидентифицированные точечные мутации в локусе *PARK2*, мутации в других локусах паркинсонизма и т.д.), которые в сочетании с рецессивной делецией (дупликацией) *PRKN* приводят к развитию клинической симптоматики.

Нами впервые в двух российских семьях с болезнью Паркинсона у пробандов выявлена полная дупликация гена *SNCA* (α -синуклеин). Эти данные в целом подтверждают, что первичные α -синуклеинопатии обычно встречаются в семейных (аутосомно-доминантных) случаях болезни Паркинсона [16]. Однако у одного из больных, поступившего в клинику как «спорадический» случай, четкие указания на положительный семейный анамнез были получены лишь в результате целенаправленного опроса уже после идентификации мутации, причем у сына пробанда имел место типичный эссенциальный тремор. Данное наблюдение демонстрирует возможную патогенетическую взаимосвязь между некоторыми вариантами первичного паркинсонизма и эссенциального тремора у носителей мутаций в гене *SNCA*.

Анализ наших данных и аналогичных результатов, полученных другими авторами, приводит к выводу о гетерогенности спорадической болезни Паркинсона. *Болезнь Паркинсона — не единая нозологическая форма, а совокупность самостоятельных (хотя и сходных) нейродегенеративных синдромов.* Причем эта гетерогенность проявляется на всех уровнях — молекулярном, биохимическом, клиническом, морфологическом. Молекулярная гетерогенность опосредована повреждениями и/или вариативностью различных генов, определяющих характер функционирования нейронов дофаминергической nigростриарной системы (примеры вариативной комбинации таких генных перестроек представлены выше). Фенотипическая гетерогенность четко проявляется, например, при сравнительном анализе ранних и поздних вариантов болезни Паркинсона: для пер-

вых характерно более благоприятное течение, нередкое начало болезни с дистонии, более частое развитие тремора (в том числе статокINETического), более быстрое развитие леводопа-индуцированных дискинезий и двигательных флуктуаций [15]. На морфологическом уровне ярким примером гетерогенности болезни Паркинсона является отсутствие в дегенерирующих нейронах телец Леви при многих вариантах «паркинопатий» [27] и наличие этих классических маркеров при поздних формах болезни; в рамках некоторых других форм первичного паркинсонизма (*PARK8* и др.) также отмечен выраженный полиморфизм — от типичной болезни Паркинсона с тельцами Леви до необычных вариантов синуклеин- и тау-патологии [41, 43].

Интересно, что анализ молекулярных основ паркинсонизма ведет не только к «расщеплению» болезни Паркинсона на отдельные формы, но и, с другой стороны, к сближению некоторых самостоятельных форм патологии. Так, показано, что с молекулярной точки зрения между болезнью Паркинсона и деменцией с тельцами Леви существуют лишь количественные различия: дупликация гена *SNCA* приводит к манифестации «чистого» паркинсоновского фенотипа, тогда как трипликация того же гена (и соответственно усиление экспрессии α -синуклеина) ведет к развитию тяжелого фенотипа с ранней деменцией и быстрым фатальным течением [10]. По-видимому, можно говорить о болезни Паркинсона и деменции с тельцами Леви как об альтернативных фенотипах единого патологического процесса — «болезни телец Леви» [3, 10], в рамках которого отдельные формы отличаются лишь степенью вовлечения различных клеточных популяций в формирование α -синуклеиновых агрегатов.

Идентификация наследуемых мутаций в определенной части случаев болезни Паркинсона, в том числе у лиц без семейного анамнеза, имеет серьезные последствия для медико-генетического консультирования, поскольку потомки таких больных имеют высокий риск заболевания. С помощью прямой ДНК-диагностики становится возможным точное установление лиц высокого риска — носителей мутаций в тех или иных «паркинсонических» генах. Такие лица должны выявляться в рамках соответствующих скрининговых программ и становиться объектами целенаправленных превентивных мероприятий (коррекция стиля жизни, диеты, профессиональных и бытовых вредностей, использование нейропротекторов и т.д.).

Список литературы

1. Загоровская Т.Б., Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А. и др. Клинико-генетический анализ ювенильного паркинсонизма в России. Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова 2004; 8: 66–72.
2. Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д., Загоровская Т.Б., Иллариошкин С.Н. Семейные случаи болезни Паркинсона (клинико-генетический анализ). Мед. генетика 2002; 5: 234–237.

3. Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003.
4. Иллариошкин С.Н., Загоровская И.А., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. Генетические аспекты болезни Паркинсона. Неврол. журн. 2002; 5: 47–51.
5. Левин О.С., Докадина Л.В. Эпидемиология паркинсонизма и болезни Паркинсона. Неврол. журн. 2005; 5: 41–49.
6. Berg D., Schweitzer K.J., Leitner P. et al. Type and frequency of mutations in the *LRRK2* gene in familial and sporadic Parkinson's disease. Brain 2005; 128: 3000–3011.

7. DeRijk M.C., Breteler M.M., Graveland G.A. et al. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam study. *Neurology* 1995; 45: 2143–2146.
8. Di Fonzo A., Tassorelli C., De Mari M. et al. Comprehensive analysis of the *LRRK2* gene in sixty families with Parkinson's disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 2006; 14: 322–331.
9. Elbaz A., Grigoletto F., Balderschi M. et al. Familial aggregation of Parkinson's disease: A population-based case-control study in Europe. *Neurology* 1999; 52: 1876–1882.
10. Farrer M., Kachergus J., Forno L. et al. Comparison of kindreds with familial parkinsonism and 6-synuclein genomic multiplications. *Ann. Neurol.* 2004; 55: 174–179.
11. Farrer M., Stone J., Mata I.F. et al. *LRRK2* mutations in Parkinson disease. *Neurology* 2005; 65: 738–740.
12. Foroud T. *LRRK2*: both a cause and a risk factor for Parkinson's disease? *Neurology* 2005; 65: 664–665.
13. Foroud T., Uniacke S.K., Liu L. et al. Heterozygosity for a mutation in the *parkin* gene leads to later onset Parkinson disease. *Neurology* 2003; 60: 796–801.
14. Gilks W.P., Abou-Sleiman P.M., Gandhi S. et al. A common *LRRK2* mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 2005; 365: 415–416.
15. Golbe L.I. Young-onset Parkinson's disease: a clinical review. *Neurology* 1991; 41: 168–173.
16. Golbe L.I. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 1999; 14: 6–9.
17. Hernandez D.G., Paisan-Ruiz C., McInerney-Leo A. et al. Clinical and positron emission tomography of Parkinson's disease caused by *LRRK2*. *Ann. Neurol.* 2005; 57: 453–456.
18. Hilker R., Klein C., Hedrich K. et al. The striatal dopaminergic deficit is dependent on the number of mutant alleles in a family with mutations in the *parkin* gene: evidence for enzymatic function in humans. *Neurosci. Lett.* 2002; 323: 50–54.
19. 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; 55: 181–184.
20. Illarionovskaya S.N., Ivanova-Smolenskaya I.A., Markova E.D. et al. Lack of a-synuclein gene mutations in families with autosomal dominant Parkinson's disease. *J. Neurol.* 2000; 247: 968–969.
21. Khan N.L., Graham E., Critchley P. et al. *parkin* disease: a phenotypic study of a large series of cases. *Brain* 2003; 126: 1279–1292.
22. Kitada T., Asakawa S., Hattori N. et al. Mutations in the *parkin* gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392: 605–608.
23. Kruger R., Vieira-Saecker A., Kuhn W. et al. Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined 6-synuclein/apolipoprotein E genotype. *Ann. Neurol.* 1999; 45: 611–617.
24. Leroy E., Boyer R., Auburger G. et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395: 451–452.
25. Lesage S., Diirr A., Tazir M. et al. *LRRK2* G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *New Engl. J. Med.* 2006; 354: 422–423.
26. Liicking C.B., Diirr A., Bonifati V. et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the *parkin* gene. *New Engl. J. Med.* 2000; 342: 1560–1567.
27. Mata I.F., Lockhart P.J., Farrer M.J. *parkin* genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2004; 13: 127–133.
28. Mata I.F., Ross O.A., Kachergus J. et al. *LRRK2* mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain. *Eur. J. Neurol.* 2006; 13: 391–394.
29. Morrison K.E. *parkin* mutations and early onset parkinsonism. *Brain* 2003; 126: 1250–1251.
30. Mouradian M.M. Recent advances in the genetics and pathogenesis of Parkinson disease. *Neurology* 2002; 58: 179–185.
31. Ozelius L.J., Senthil G., Saunders-Pullman R. et al. *LRRK2* G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *New Engl. J. Med.* 2006; 354: 424–425.
32. Paisan-Ruiz C., Jain S., Evans E.W. et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neurol.* 2004; 44: 595–600.
33. Paisan-Ruiz C., Lang A.E., Kawarai T. et al. *LRRK2* gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. *Neurology* 2005; 65: 696–700.
34. Piccini P., Burn D.J., Ceravolo R. et al. The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. *Ann. Neurol.* 1999; 45: 577–582.
35. Singleton A.B., Farrer M., Johnson J. et al. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 841.
36. Tan E.K., Khajavi M., Thoronby J.I. et al. Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease. *Neurology* 2000; 55: 533–538.
37. Veldman B., Wijn A., Knoers N. et al. Genetic and environmental risk factors in Parkinson's disease. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 1998; 100: 15–26.
38. Vieregge P., Hagenah J., Heberlein I. et al. Parkinson's disease in twins: a follow-up study. *Neurology* 1999; 53: 566–572.
39. Vila M., Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat. Med.* 2004; 10 (Suppl.): S58–S62.
40. West A., Periquet M., Lincoln S. et al. Complex relationship between *parkin* mutations and Parkinson disease. *Am. J. Med. Genet.* 2002; 114: 584–591.
41. Wszolek Z.K., Pfeiffer R.F., Tsuboi Y. et al. Autosomal dominant parkinsonism associated with variable synuclein and tau pathology. *Neurology* 2004; 62: 1619–1622.
42. Zabetian C.P., Samii A., Mosley A.D. et al. A clinic-based study of the *LRRK2* gene in Parkinson disease yields new mutations. *Ibid.* 2005; 65: 741–744.
43. Zimprich A., Biskup S., Leitner P. et al. Mutations in *LRRK2* cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron.* 2004; 44: 601–607.

Heterogeneity of sporadic Parkinson's disease: molecular approach to solving the problem

S.N. Illarioshkin¹, P.A. Slominsky², M.I. Shadrina², G.Kh. Bagyeva¹, T.B. Zagorovskaya¹, E.D. Markova¹,
A.V. Karabanov¹, V.V. Poleshchuk¹, E.V. Polevaya¹, N.V. Fedorova³, S.A. Limborskaya², I.A. Ivanova-Smolenskaya¹

¹ Institute of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

² Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow

³ Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow

Key words: Parkinson's disease, sporadic cases, mutation analysis, genetic heterogeneity, genetic counseling.

We performed search for mutations in the *LRRK2*, *PRKN* (*parkin*) and *SNCA* (α -synuclein) genes in 359 patients of Slavonic ethnic origin (169 men and 190 women) with Parkinson's disease, of whom 345 represented sporadic cases. Age at the disease onset was from 23 to 84 years, and patients with juvenile parkinsonism (debut of symptoms before 20 years) were excluded from enrollment. On study of a major mutation G2019S in the gene *LRRK2*, as well as of structural rearrangements in the *PRKN* and *SNCA* genes it was established that in Parkinson's disease the frequency of these mutations is 7.5% (27 patients of 359). The mutation *LRRK2*-G2019S was found in 1.1% of patients, *parkin* gene exon-

ic rearrangements in 5.8% (including 10.7% patients with an early form of Parkinson's disease and 1.7% patients with a late form of the disease), and *SNCA* gene duplication in two patients. The performed analysis showed marked heterogeneity of the molecular structure of Parkinson's disease in Russian population, which allows to consider this disorder not to be a unified form but rather a group of separate (although similar) neurodegenerative syndromes. The identification of inherited mutations in a part of sporadic cases of Parkinson's disease changes significantly the familial prognosis and requires genetic counseling in persons from the 'high risk' group.