

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
\_\_\_\_\_ Е. И. Шишацкая

« 19 » июня 2018 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Использование молекулярно-генетических методов для оценки риска раннего  
развития нейродегенеративных заболеваний

Научные руководители \_\_\_\_\_ доцент, к.б.н., Т.Н. Субботина,  
\_\_\_\_\_ врач-невролог В.Г. Абрамов

Выпускник \_\_\_\_\_ Е.А. Серова

Красноярск 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	<b>3</b>
<b>Основная часть</b> .....	<b>5</b>
1 Обзор литературы.....	5
1.1 Молекулярно-генетические методы в оценке развития нейродегенеративных заболеваний.....	5
1.1.1 Клиническая диагностика нейродегенеративных заболеваний.....	5
1.1.2 Молекулярно-генетические методы в диагностике нейродегенеративных заболеваний .....	6
1.1.3 Наборы реагентов для проведения MLPA-анализа SALSA MLPA P051 Parkinson mix 1 и SALSA MLPA P052 Parkinson mix 2 .....	8
1.2 Этиология и патогенез Болезни Паркинсона.....	8
1.3 Гены, вовлеченные в патогенез БП.....	11
1.3.1 Ген SNCA.....	11
1.3.2 Ген LRRK2.....	13
1.3.3 Ген PINK1.....	15
1.3.4 Ген PARK7.....	16
1.3.5 Ген PARK2.....	16
1.3.6 Ген ATP13A2.....	17
1.3.7 Ген GCH1.....	18
1.3.8 Ген UCHL1.....	19
1.3.9 Гены CAV1 и CAV2.....	20
1.3.10 Ген GBA.....	20
2 Материалы и методы.....	22
2.1 Объект исследования.....	22
2.2 Выделение ДНК набором Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit.....	22
2.3 Измерение концентрации ДНК.....	23
2.4 Методика проведения MLPA-анализа.....	24
2.5 Анализ результатов с помощью программного обеспечения Coffalyser.Net.....	27
3 Результаты и обсуждения.....	28
3.1 Результаты проведения MLPA-анализа набором SALSA MLPA P052 Parkinson mix 2.....	28
3.2 Результаты проведения MLPA-анализа набором SALSA MLPA P051 Parkinson mix 1.....	30
3.3 Обсуждение полученных результатов.....	33
<b>Заключение</b> .....	<b>35</b>
<b>Список литературы</b> .....	<b>36</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания головного мозга – наиболее распространенные и трудно поддающиеся лечению болезни, приводящие к инвалидизации и смерти пациентов. Поэтому своевременная диагностика и исследование патогенеза этих заболеваний будут способствовать созданию средств профилактики и снижению возможных рисков их развития. В последние годы число исследований, касающихся болезни Паркинсона (БП), неуклонно растет. Этиология болезни Паркинсона (БП) все еще остается неразгаданной, несмотря на многолетние исследования. Около 5-10% случаев БП представлены моногенными формами, проявляющимися преимущественно у лиц более молодого возраста, тогда как большинство случаев заболевания являются спорадическими и имеют мультифакторную природу. Ключевым молекулярным событием в развитии нейродегенерации при БП является нарушение конформации везикулярного белка  $\alpha$ -синуклеина, инициирующее его фибриллизацию с формированием нейротоксичных цитоплазматических агрегатов и телец Леви. Патологическое действие белка  $\alpha$ -синуклеина при БП обусловлена специфическим взаимодействием средовых факторов, особенностей генома и системного метаболизма, что в совокупности определяет характер процессов клеточной детоксикации, функционирования митохондрий, синаптической трансмиссии и эндосомального транспорта [1].

Один из наиболее часто задаваемых вопросов, которые интересуют родственников и пациентов, страдающих БП: «Является ли данное заболевание генетически обусловленным?». По данным проведенных исследований, в ряде случаев действительно удастся найти связь генной мутации с развитием этого заболевания. В частности, мутация  $\alpha$ -синуклеина, гена LRRK2, гена паркина, PTEN-индуцированной киназы 1, гена DJ-1 приводит к развитию семейных случаев заболевания БП. Однако изолированный аутосомно-рецессивный или доминантный тип наследования встречается довольно редко. Кроме того, риск развития БП при наличии данного заболевания у родственников первой линии выше в три раза, чем в среднем в популяции. Причину избирательной наследуемости связывают с наличием так называемых генов риска, которые увеличивают вероятность развития БП у того или иного индивидуума [2]. Поэтому выявление мутаций в генах, вовлеченных в патогенез БП, может стать рекомендацией к профилактике развития данной патологии.

Информацию о наиболее полном спектре всех мутаций, ассоциированных с развитием БП, за относительно короткое время, можно получить при использовании технологии MLPA (Мультиплексная амплификация лигированных зондов) и секвенатора с функцией капиллярного электрофореза.

Сегодня не существует лекарственных средств, способных предотвратить или замедлить процесс нейродегенерации. Подбор нейропротекторной терапии осложняется тем, что клиническая симптоматика заболевания проявляется при гибели около 80% нейронов черной субстанции, а также отсутствием лабораторных методов диагностики заболевания на преклинической стадии и мониторинга ответа на применяемую лекарственную терапию.

Таким образом, цель работы – освоение и использование MLPA анализа с целью анализа мутаций, ассоциированных с Болезнью Паркинсона. Исходя из поставленной цели, были сформированы следующие задачи:

1. Провести литературный поиск генов, ассоциированных с Болезнью Паркинсона.

2. Освоить метод фрагментного анализа на генетическом анализаторе АВ3500.

3. Провести анализ по поиску мутаций в генах, ассоциированных с БП для пациентов г. Красноярска, страдающих данной патологией.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1 Обзор литературы

#### 1.1 Молекулярно-генетические методы в оценке развития нейродегенеративных заболеваний

##### 1.1.1 Клиническая диагностика нейродегенеративных заболеваний

На сегодняшний день нейродегенеративные заболевания, такие как, например Болезнь Паркинсона и Болезнь Альцгеймера (БА) проявляет высокую гетерогенность в отношении лежащего в основе молекулярного патогенеза с участием многих, до конца не изученных, путей и механизмов. Диагностика нейродегенеративных заболеваний все еще сложна и полностью зависит от клинических симптомов [3].

Согласно Английскому обществу Brain Bank по клинической диагностике Болезни Паркинсона для постановки диагноза БП необходимо наличие следующих симптомов: брадикинезия (замедленность) в сочетании с хотя бы одним из трех симптомов – мышечной ригидностью, тремором покоя, постуральной неустойчивостью, не вызванной вестибулярной, мозжечковой или проприоцептивной дисфункцией [4]. Эти же критерии постановки диагноза БП используются в России.

Подтверждением диагноза БП является обнаружение телец Леви в черной субстанции при патоморфологическом исследовании, что невозможно при жизни больного. Прижизненная диагностика БП базируется на выявлении клинических признаков заболевания и дифференциальной диагностике с другими заболеваниями, сопровождающимися симптомами паркинсонизма. Кроме БП, похожая симптоматика может отмечаться при вторичном паркинсонизме (лекарственном, сосудистом, токсическом, постэнцефалическом и др.), при других нейродегенеративных заболеваниях (прогрессирующий надъядерный паралич, кортикобазальная дегенерация, мультисистемная атрофия и др.) и при наследственных заболеваниях ЦНС, таких как болезнь Вильсона-Коновалова, болезнь Галлервордена-Шпатца, дофачувствительная дистония, ювенильная форма болезни Гентингтона и др. [5].

Также клиническая диагностика нейродегенеративных заболеваний осложняется тем, что на ранних стадиях заболевания описанная выше симптоматика может и не наблюдаться. Это говорит о том, что необходимы методы лабораторной и инструментальной диагностики, позволяющие облегчить постановку диагноза. В настоящее время для подтверждения нейродегенеративных заболеваний используют нейровизуализационные техники исследования головного мозга. Магнитно-резонансная томография используется непосредственно для дифференциальной диагностики нейродегенеративных заболеваний и позволяет, например, исключить такие структурные поражения головного мозга, как опухоли базальных ганглиев или сосудистые поражения, а также позволяет диагностировать вторичный паркинсонизм. При БА МРТ диагностика предназначена определить наиболее характерные для данной патологии изменения, среди которых выделяют

наличие церебральной атрофии, вторичное расширение борозд и желудочков, уменьшение объема вещества головного мозга.

Также при постановке диагноза БП используют метод позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), являющийся методом прижизненного изучения метаболической и функциональной активности тканей организма. В основе метода лежит феномен позитронной эмиссии, наблюдаемый во введённом в организм радиофармпрепарате при его распределении и накоплении в различных органах. В неврологии основная точка приложения метода - изучение метаболизма головного мозга при ряде заболеваний. С помощью ПЭТ исследуется обмен дофамина путем ввода в организм препарата леводопы – предшественника синтеза дофамина с радиоактивной меткой и наблюдением за обменом веществ и синтезом дофамина, т.к. это является одним из механизмов, лежащем в основе патогенеза БП.

Недостаток нейровизуализационных техник исследования головного мозга в том, что они экономически не выгодны и не являются общедоступными. Если МРТ диагностика еще хоть как-то распространена среди жителей России, то о доступности и распространенности ПЭТ в России говорить не приходится.

### **1.1.2 Молекулярно-генетические методы в оценке риска развития нейродегенеративных заболеваний**

В последнее время молекулярно-генетические методы диагностики нейродегенеративных заболеваний становятся все более распространены, в связи с тем, что научные исследования все чаще подтверждают то, что нейродегенеративные заболевания могут быть генетически-обусловленными. А это означает, что существуют генетические маркеры, наличие которых может приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний. Разнообразие мутаций и генов, вовлеченных в патогенез нейродегенеративных заболеваний удобно рассмотреть на примере БП. Выявлен целый ряд генов, вовлеченных в развитие как семейной, так и спорадической формы БП. Согласно последним данным полногеномных исследований ассоциаций, в развитии БП далеко не последнюю роль могут играть однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП) [6]. Так, например, существует ассоциация полиморфизма rs2736990 (С/Т) в гене SNCA с риском развития спорадической формы болезни Паркинсона для российской популяции. Показано, что носительство аллеля С по данному полиморфизму повышает риск развития болезни Паркинсона в 1,75.

Также показано, что часто патогенезы нескольких неврологических расстройств, включая болезнь Паркинсона, сопровождаются мутациями, получившими название CNV (copy number variation) или вариации числа копий генов [7].

Вариации числа копий генов – это вид генетического полиморфизма, к которому относят различия индивидуальных геномов по числу копий хромосомных сегментов размером от 1 тыс. до нескольких млн. пар оснований. CNV возникают в результате несбалансированных хромосомных перестроек, таких как делеции и дупликации. Значительный полиморфизм по CNV у

человека стал очевиден после окончания полного секвенирования нескольких геномов. Крупные делеции или дупликации могут быть выявлены при микроскопическом анализе метафазных хромосом, однако, подавляющая часть CNV выявляется при помощи сравнительной геномной гибридизации и при полногеномном SNP-генотипировании. Результатом вариации может явиться снижение или повышение числа копий определенного гена, и, следовательно, пониженная или повышенная экспрессия продукта гена — белка или некодирующей РНК.

Для выявления некоторых CNV мутаций в настоящее время исследователи пользуются методом ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов. Данный метод пригоден для массового скрининга больных на мутации с изменением копийности в генах PARK2 и SNCA. При проведении анализа мутаций с изменением копийности в генах PARK2 и SNCA показано, что делеции и дупликации экзонов гена PARK2 вносят существенный вклад в развитие спорадической формы болезни Паркинсона в российской популяции. [8]. Быстрота исполнения, точность в определении числа копий экзонов, относительно невысокая стоимость и безопасность данного метода делают возможным его применение для массового анализа больных.

Еще одним методом выявления мутаций в генах, вовлеченных в патогенез нейрогенеративных заболеваний является использование ДНК-чиповых технологий. При этом используются ДНК-чипы, позволяющие анализировать, как полиморфные варианты в целом геноме, так полиморфные варианты в ограниченном числе генов, связанных с определенными метаболическими путями. Здесь стоит отметить исследование М.И. Шадринной [8]. В данном исследовании при создании чипа были выбраны наиболее часто (более чем в двух семьях) встречающиеся точковые мутации в генах моногенных форм БП и целый ряд однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП), расположенных в генах, вовлечённых в патогенез данного заболевания. Таким образом, было проанализировано 68 точковых мутаций и 29 ОНП в ряде генов. Необходимо отметить, что большинство мутаций и ОНП, представленных на чипе, располагается в генах PARK2 и LRRK2, что составляет соответственно более 58% и 19% от всех мутаций и ОНП на чипе.

Таким образом, описанные методы являются, бесспорно, хорошими, доступными и точными. Их недостаток в том, что таким образом можно определить лишь узкий спектр мутаций, выявление которых имеет важное значение для оценки риска развития нейродегенеративных заболеваний. Так как спектр мутаций при БП очень разнообразен целесообразно использовать такой метод определения мутаций, который способен идентифицировать разного рода мутации — от однонуклеотидных полиморфизмов до вариаций числа копий генов. Таким методом является MLPA-анализ. Технология MLPA представляет собой мультиплексную лигазозависимую амплификацию зондов (от англ. Multiplex ligation-dependent probe amplification — MLPA). Для данной методики компанией MRC-Holland разработаны специальные наборы для определения разного рода мутаций одновременно в ряде генов.

### **1.1.3 Наборы реагентов для проведения MLPA-анализа SALSA MLPA P051 Parkinson mix 1 и SALSA MLPA P052 Parkinson mix 2**

После обзора множества статей и публикаций, как российских, так и зарубежных, была собрана информация о мутациях в генах, ассоциированных с развитием Болезни Паркинсона. Мутации встречаются очень разнообразные – от однонуклеотидных замен до делеций в 14.000 пар нуклеотидов. Поскольку мутации очень разнообразные, много и каждая из них может влиять на развитие БП целесообразно проводить такой тип анализа, с помощью которого возможно было бы охватить весь спектр генов, вовлеченных в патогенез БП. Таким методом является MLPA-анализ. Преимущество MLPA- анализа в том, что он позволяет за одну постановку определять все описанные выше мутации. Компанией MRC-Holland разработано большое количество коммерческих наборов реагентов для проведения MLPA-анализа, в том числе для оценки риска развития нейродегенеративных заболеваний. Для выявления мутаций в генах, вовлеченных в патогенез БП, компанией разработаны два набора реагентов: SALSA MLPA P051 Parkinson mix 1 и SALSA MLPA P052 Parkinson mix 2. С помощью двух данных наборов проводится анализ 65 мутаций в следующих генах PINK1, SNCA, ATP13A2, LRRK2, PARK2, PARK7, UCHL-1, GCH1, CAV-1, CAV-2. Мутации в перечисленных генах могут приводить к развитию БП с разной долей вероятности. Также распространенность мутаций в этих генах сильно различается при спорадических и при семейных случаях БП.

## **1.2 Этиология и патогенез Болезни Паркинсона**

Болезнь Паркинсона (БП) — хроническое нейродегенеративное заболевание, сопровождающееся прогрессирующим разрушением и гибелью дофаминовых нейронов в центральной нервной системе. Болезнь Паркинсона была известна и ранее под названием «дрожательный паралич», но подробно и полно её впервые описал в 1817 году Джеймс Паркинсон в своей книге «Эссе о дрожательном параличе». По имени первоописателя эта болезнь и была впоследствии названа болезнью Паркинсона [9].

По данным ряда российских ученых [10] в России распространенность БП, предположительно, составляет 127 случаев на 100000 населения среди лиц в возрасте 50-59 лет, 493 случая на 100000 населения среди людей старше 80 лет. С помощью проведения эпидемиологических исследований удалось выявить факторы риска развития БП: пожилой возраст, мужской пол, наличие родственников, страдающих паркинсонизмом, контакт с гербицидами и пестицидами. По данным О.С. Левина в 10% случаев выявляется положительный семейный анамнез. При наличии БП у одного из родственников риск развития БП увеличивается в 2-2,5 раза, при заболевании двух родственников – риск возрастает более чем в 10 раз. Если у одного из сибсов выявляется БП, то генетический риск увеличивается еще в 4 – 5 раз [10].

Этиология БП неизвестна. Предполагается, что в основе развития заболевания лежат возрастные, средовые и генетические факторы. БП носит преимущественно спорадический характер, однако при наличии БП у ближайших родственников риск ее развития возрастает в 2 раза. С

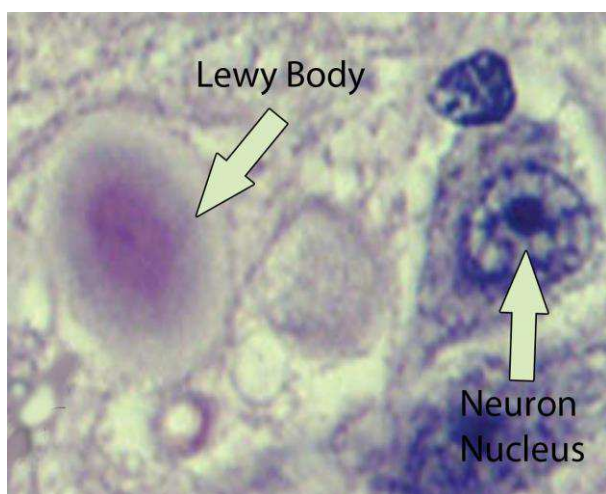


наследственными факторами связано лишь небольшое количество случаев БП (5–10%). Возможно, генетическая предрасположенность определяет увеличение чувствительности нигростриарной системы к влиянию повреждающих факторов и процессов старения [11].

Возраст является наиболее доказанным независимым фактором риска развития БП. Хорошо известно, что, при средней популяционной распространенности от 120 до 180 случаев на 100 000 населения, встречаемость БП среди лиц старше 60 лет достигает 1%, а в группе лиц старше 80 лет – уже около 4% [12]. Суммарно в мире насчитывается около 6 млн. больных БП, большая часть из которых приходится на пожилое население (лишь каждый десятый пациент заболевает БП до 50 лет) [12]. Причины, по которым БП ассоциирована с пожилым возрастом, достаточно хорошо изучены и связаны с истощением пластических способностей ЦНС по мере старения. Состояние организма в зрелом возрасте и в старости характеризуется хроническим окислительным стрессом, накоплением мутаций ДНК, угнетением функции убиквитин-протеасомной системы, снижением способности нейронов к активизации стрессового ответа.

Любой из этих факторов или их комбинация способствуют тому, что начальные изменения укладки (свойств)  $\alpha$ -синуклеина либо других нейрональных белков-мишеней, которые у молодых лиц были бы сравнительно легко устранены мощными эндогенными защитными системами, у стариков становятся непреодолимыми и ведут к «запуску» фатального цитотоксического каскада и гибели клетки.

Из экзогенных факторов на сегодняшний день наиболее доказанной для БП может считаться этиопатогенетическая роль ряда нейротоксинов – в первую очередь, ингибиторов дыхательной цепи митохондрий (пестициды, гербициды, инсектициды) и ингибиторов протеасомного комплекса [13]. Это подтверждается выявленной распространенностью БП в сельских популяциях среди фермеров. Она почти в 1,4 раза выше по сравнению с городским населением, а риск БП у работников плантаций – в 1,5–2 раза выше общепопуляционного [14]. Молекулярной основой указанной ассоциации служит тот факт, что ряд пестицидов и гербицидов (ротенон, диелдрин, паракват и др.) могут провоцировать конформационные изменения молекулы клеточного белка  $\alpha$ -синуклеина и существенно ускорять темп формирования в нейронах  $\alpha$ -синуклеиновых фибрилл. Как раз они являются основным субстратом патоморфологических клеточных маркеров БП – тельца Леви (Рисунок 1). Тельца Леви —



**Рисунок 1 - Тельце Леви**

патологические белковые образования внутри нейронов. Были впервые обнаружены немецким неврологом Фредериком Леви в 1912 году. Классические тельца Леви представляют собой

эозинофильные цитоплазматические включения, состоящие из плотного ядра, окруженного ореолом из радиально расходящихся фибрилл шириной в 10 нанометров. Тельца Леви состоят из различных белков, жирных кислот, полисахаридов. Основными белковыми компонентами этих включений являются альфа-синуклеин, белки нейрофиламентов, убиквитин [15].

Интересно то, что большая часть альфа-синуклеина, входящего в состав телец Леви, фосфорилирована в положении Ser129.

Также, существует и живо обсуждается гипотеза о том, что конформационные изменения молекулы  $\alpha$ -синуклеина, которые происходят от влияния токсических агентов либо в результате случайных стохастических причин в стареющих нейронах, могут индуцировать дальнейшую трансинаптическую передачу патологической формы белка  $\alpha$ -синуклеина от клетки к клетке, что дает отражение тому факту, что при БП наблюдается прогрессирование образования телец Леви [16]. Такой эффект имеет большое сходство с молекулярными механизмами прионных болезней [17].

Роль наследственности в возникновении БП предполагалась еще в начале прошлого столетия. В настоящее время нет никаких сомнений в том, что БП – генетически обусловленная патология и способна передаваться по наследству. Это четко установлено большим количеством эпидемиологических и популяционных исследований [18,19]. При анализе обширных выборок больных было доказано, что наличие положительного семейного анамнеза является одним из ведущих факторов риска развития БП. Для паркинсонизма имеется четкая тенденция к внутрисемейному накоплению случаев заболевания, а положительный семейный анамнез был найден у 10–24% больных. Риск возникновения болезни среди родственников первой степени родства варьирует от 4 до 10%, значительно превышая общепопуляционный. Такое семейное накопление также особенно характерно для ранних (до 40 лет) случаев БП.

На сегодняшний день обнаружено множество генов, мутации в которых ассоциированы с БП. Основными генами, мутации в которых приводят к развитию заболевания, являются SNCA, LRRK2, DJ1, PINK1 и ATR13A2. [20]. А также ген GBA, который относительно недавно начал привлекать внимание ученых. Наряду с этим описано множество мутаций, которые самостоятельно не могут вызывать БП, но при наличии дополнительных факторов риска способствуют её возникновению, обеспечивая тем самым предрасположенность к БП [21].

Носительство любого из «аллелей риска» указанных генов не является фатальным само по себе, но создает неблагоприятный (предрасполагающий) метаболический фон, который может реализоваться в болезнь при условии воздействия тех или иных дополнительных факторов – токсических, конституциональных и др. Между генетическими и средовыми факторами, определяющими предрасположенность к БП, существует отчетливое взаимодействие. В ряде работ были получены данные, которые демонстрируют, что при длительном контакте с пестицидами вероятность развития БП особенно

высока у лиц – носителей неблагоприятных аллелей генов, вовлеченных в патогенез БП.

Одна из проблем диагностики и лечения БП является то, что ключевым элементом патогенеза болезни является гибель дофаминергических нейронов nigrostriатной системы, которые отвечают за регуляцию моторной функции. Моторные симптомы появляются впервые у больных спустя много лет после начала нейродегенерации при потере существенного количества дофаминергических нейронов и истощении компенсаторных резервов мозга, что объясняет низкую эффективность традиционного лечения. Поэтому разработка ранней – доклинической – диагностики болезни Паркинсона, относится к важнейшим приоритетам неврологии.

### **1.3 Гены, вовлеченные в патогенез БП**

#### **1.3.1 Ген SNCA**

В настоящее время в качестве основного звена патогенеза БП рассматривается формирование нейротоксических агрегатов небольшого нейронального белка альфа-синуклеина [22]. Механизмы нейродегенерации остаются неизвестными, однако пристальное внимание уделяется исследованию как факторов, влияющих на формирование агрегатов альфа-синуклеина, так и изучению роли посттрансляционной модификации этого белка в регуляции его функций и метаболизма.

Альфа-синуклеин – небольшой нейрональный белок, который обнаруживается в основном в пресинаптических терминалях. Выявляется в различных отделах головного мозга, преимущественно в неокортексе, гиппокампе и черной субстанции [23]. Альфа-синуклеин присутствует также и в других клетках головного мозга – астроцитах и олигодендроглиоцитах. Общее количество альфа-синуклеина составляет примерно 1% от общего пула растворимого белка головного мозга. Ген, кодирующий белок альфа-синуклеин (SNCA), картирован на четвертой хромосоме (локус 4q21) и состоит из шести экзонов, из которых транскрибируются только пять, исключая первый экзон. В результате альтернативного сплайсинга образуются три изоформы белка (140 аминокислот, 126 аминокислот и 112 аминокислот), из которых основной является 140-изоформа [24].

Было обнаружено, что, по меньшей мере пять мутаций в гене SNCA вызывают БП. Мутации гена SNCA ассоциируются с ранней формой заболевания, которая обычно возникает до 50 лет. Было обнаружено, что другие изменения в гене SNCA повышают риск развития болезни Паркинсона, хотя они и не являются прямой причиной.

Описаны следующие мутации гена SNCA у людей с БП - Ala53Thr (A53T), Ala30Pro (A30P). Эти мутации приводят к тому, что альфа-синуклеиновый белок приобретает неправильную трехмерную форму (misfold). В другом типе мутаций SNCA в каждой клетке дублируется или триплицируется. Дополнительные копии гена SNCA приводят к избытку альфа-

синуклеина. Механизмы дупликации и триплекции гена до сих пор не известны.

Исследование роли альфа-синуклеина в патогенезе БП началось с открытия в 1997 г. мутаций в гене SNCA, приводящих к развитию аутосомно-доминантных форм заболевания. Первая мутация альфа-синуклеина (A53T) была идентифицирована в одной итальяно-американской семье [25] и позднее она же была описана еще в нескольких итальянских и греческих семьях с аутосомно-доминантной формой БП. Идентифицированы еще две точковые мутации: A30P – в немецкой семье и E46K – в семье баско-испанского происхождения. При этом точковые мутации гена SNCA являются весьма редкими. На 2011 годы было описано всего не более 15 семей с БП, ассоциированной с точечными мутациями SNCA. Наиболее распространенными среди пациентов с наследственной формой БП оказались мультипликации гена SNCA, приводящие к развитию аутосомно-доминантной формы заболевания. Интересно отметить, что имеются различия в клинических картинах заболеваний у пациентов с дупликацией и трипликацией гена SNCA. Тяжесть заболевания коррелирует с числом копий этого гена: у пациентов с дупликацией гена SNCA начало заболевания приходилось на возраст старше 40 лет и не отличалось от спорадической формы БП [26]. При наличии трипликации гена SNCA наблюдается раннее начало БП (до 40 лет) и нередкое развитие более тяжелого фенотипа деменции с тельцами Леви. Мультипликации гена SNCA детектируется у 1,5% пациентов с семейной формой БП [25]. У пациентов с БП, обусловленной мультипликацией SNCA, в нейронах черной субстанции наблюдается повышение уровня мРНК гена SNCA и увеличение количества растворимого альфа-синуклеина, а также повышенное образование агрегатов этого белка. Интересно отметить, что у пациентов с мультипликацией гена SNCA в клетках крови также наблюдается увеличение количества мономерного альфа-синуклеина, но не его агрегированных форм [26].

Показано ингибирующее влияние альфа-синуклеина на мембранное слияние. Слияние мембран является важным биологическим процессом, включая поддержание базовой клеточной организации у эукариот. Событие слияния пузырька осуществляется множественными скоординированными ступенями, такими как нахождение цели, связывание с ней, первичный и финальный запуск события слияния. Согласно имеющейся модели, пузырьки, захваченные с помощью Rab белков или других факторов, подтаскиваются к белкам SNARE. Сборка стержневого комплекса SNARE затем направляет две мембраны навстречу друг к другу и создает соответствующее искривление и натяжение мембран. Когда мембраны достаточно сближены, происходит полуслияние в результате слияния отверстий пор и их расширения, затем следует полное слияние мембран [27]. F. Kamp и соавт. (2010) на культуре клеток *Caenorhabditis elegans* (свободноживущая нематода) с повышенной выработкой альфа-синуклеина показали, что он связывается с митохондриями и приводит к митохондриальной фрагментации, а также может смещать динамическое морфологическое равновесие митохондрий к уменьшенному

слиянию за счет его уникального мембранного взаимодействия. Наконец, митохондриальная фрагментация, вызванная экспрессией альфа-синуклеина, возобновляется коэкспрессией PINK, но не БП-ассоциированными мутациями гена PINK1 G309D. Мутации в гене альфа-синуклеина (A53T, A30P) сопровождаются нарушением стабильности центральной части белковой молекулы, изменением её пространственной организации и формированием бета-складчатых слоев, способных агрегировать с другими аналогичными молекулами с образованием мультимолекулярных фибрилл.

Три независимых исследования по полногеномному сканированию выявили ассоциацию локуса, содержащего ген SNCA, с повышенным риском БП. Убедительным доказательством нейротоксичности альфа-синуклеина стало создание трансгенных животных (дрозофила, мышей) на основе гиперэкспрессии гена SNCA человека, демонстрирующих нейрональные альфа-синуклеин-позитивные включения и дегенерацию дофаминергических нейронов мозга [28].

### 1.3.2 Ген LRRK2

Последним из числа генов моногенных форм болезни Паркинсона был идентифицирован LRRK2 ген (leucine-rich repeat kinase 2, англ.), кодирующий белок дардарин [29]. Эти мутации были сначала выявлены в семьях с аутосомно-доминантной болезнью Паркинсона с поздним началом развития - но затем было обнаружено, что эти мутации встречаются также у больных со спорадической формой заболевания. В гене дардарина выявлена миссенс мутация G2019S. Она найдена у больных из разных этнических групп у больных как с семейной, так и с спорадической формой заболевания и которая является самой частой из всех описанных при болезни Паркинсона точковых мутаций. Мутация G2019S выявлена в популяциях европейского происхождения примерно у 1-2% больных спорадической формой болезни Паркинсона и у 5-7% больных с семейным паркинсонизмом, но крайне редко встречается у монголоидов. Анализ сцепленных с мутацией G2019S гаплотипов говорит о том, что скорее всего данная мутация возникла в эволюции человека один раз в Центральной Европе в XIII столетии [30].

Ген LRRK2 кодирует большой белок (2527 аминокислотных остатков, 286 кДа), содержащий ряд функциональных доменов, в том числе киназный и GTPазный. На настоящий момент нет знаний о физиологических субстратах LRRK2-киназы, а значит представление о клеточных функциях этого фермента остается не ясным. Протеинкиназа LRRK2 входит в семейство белков ROCO, так как наряду с киназным доменом содержит домены ROC и COR. Считается, что LRRK2 обладает как киназной, так и GTPазной активностями, которые могут быть взаимосвязанными. LRRK2 – это крупный белок, способный к образованию гомо- и, предположительно, гетеродимеров, с центральной GTPазной/киназной каталитической областью, окруженной мотивами, вовлеченными в белок-белковые и, возможно, белок-мембранные взаимодействия.

Мутации в гене LRRK2 обнаруживаются в различных популяциях в семьях с аутосомно-доминантной формой БП, а также при спорадической форме этого заболевания и считают наиболее частой причиной развития БП. Из всех известных мутаций в гене LRRK2 (около 75% мутантных аллелей) при БП наиболее распространена мутация G6055A, приводящая к замене глицина в положении 2019 на серин (G2019S) в киназном домене. В европейских популяциях эту мутацию выявляют в 5–7% случаев семейной БП и в 0.6–1.6% спорадических случаев. В некоторых изолированных популяциях, например, среди арабов Северной Африки и евреев-ашкенази, частота этой мутации при семейных формах БП достигает 30–40% [30]. Следует отметить, что мутация G2019S не обнаружена в некоторых азиатских популяциях. В настоящее время в гене LRRK2 описано более 50 мутаций [31]. Все мутации (в основном миссенс-мутации), обнаруженные в гетерозиготном состоянии, сегрегировали с заболеванием и не встречались в контрольной выборке. Кроме того, мутации в гене LRRK2 не найдены при других неврологических заболеваниях [32].

Мутация гена LRRK2, картированная на хромосоме 12q12, сцепленная с локусом PARK8, является наиболее частой причиной развития семейной формы БП с аутосомно-доминантным типом наследования.

В России частота мутаций в гене LRRK2 при БП оказалась сопоставимой с частотой в большинстве европейских популяций и составила 5% случаев семейной и примерно в 0.6% спорадической БП для мутации G2019S [32]. Как показано в ряде работ, возраст начала заболевания, а также тяжесть его течения могут варьировать у носителей одной и той же мутации в гене LRRK2 даже в пределах одной семьи. Мы сопоставили осложнения, развившиеся в двух группах больных, которые принимали Л-ДОФА более пяти лет и положительно отвечали на терапию. Эти группы различались тем, что в одной были носители мутации G2019S в гене LRRK2, а в другой такой мутации не было. В группе с наследственной формой БП и мутацией G2019S наблюдалось повышение частоты побочных эффектов. Таким образом, очевидно, что с целью диагностики наследственной аутосомно-доминантной формы БП, в том числе в России, у больных семейной формой заболевания следует, в первую очередь, выявлять мутацию G2019S LRRK2. Такое тестирование может быть полезным в качестве дополнительного теста при проведении дифференциальной диагностики с другими неврологическими заболеваниями, а также при молекулярно-генетическом обследовании родственников больных с этой мутацией, что позволит выявить БП еще на преклинической стадии.

Известно, что в молекуле  $\alpha$ -синуклеина фосфорилированию может подвергаться один из пяти аминокислотных остатков (S87, Y125, S129, Y133, S136). Наиболее хорошо изучен белок, содержащий фосфорилированный Ser129 (S129). Фосфорилирование S129 усиливает формирование филаментов и олигомерных форм  $\alpha$ -синуклеина, оно преобладает в  $\alpha$ -синуклеин-положительных тельцах Леви в нейронах черной субстанции при БП. Возможное взаимодействие LRRK2 и  $\alpha$ -синуклеина косвенно подтверждается их колокализацией в тельцах Леви. Учитывая тот факт, что тельца Леви выявляются в аутоптатах головного мозга большинства больных с мутациями в

гене LRRK2, можно предположить, что LRRK2 непосредственно участвует в фосфорилировании  $\alpha$ -синуклеина. В одной из иностранных работ [33], показано, что лизат клеток, экспрессирующих ген LRRK2, обладает способностью фосфорилировать рекомбинантный  $\alpha$ -синуклеин в положении S129.

### 1.3.3 Ген PINK1

PINK1 (phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1) был обнаружен на локусе PARK на участке 1p35-p36 в большой сицилийской семье с аутосомно-рецессивной формой болезни, которая клинически характеризовалась ранним дебютом (в возрасте 32-48 лет) с типичным фенотипом БП. Ген содержит 8 экзонов и кодирует белок из 581 остатков аминокислоты (63 кДа), который является PTEN-индуцированной киназой (PINK1). Мутации в PINK1 идентифицируют в 1-7% случаев раннего проявления болезни Паркинсона (БП) (в зависимости от популяции), а следовательно они признаны второй наиболее распространенной причиной ранней формы этого заболевания. PINK1 - это протеинкиназа, которая обладает нейропротекторным эффектом благодаря фосфорилированию специфических митохондриальных белков. Посмертный анализ носителей мутаций PINK1 показал типичные проявления БП с нейрональными потерями и включениями в виде телец Леви в поврежденных регионах, также было показано, что белок является иммунореактивным к тельцам Леви при БП и деменции с тельцами Леви [34]. Мутация G411S в гомозиготном варианте приводит к раннему (до 45 лет) началу болезни Паркинсона. При падении потенциала на мембране митохондрии белок PINK1 фосфорилируется по Ser-402 и становится активным. Активированная протеинкиназа PINK1 рекрутирует паркин к внешней мембране поврежденной митохондрии (Рисунок 2). Паркин (PARK2), который является E3-убиквитин-лигазой, убиквитинилирует свои субстраты на поверхности митохондрии, и это служит сигналом для направления такой поврежденной митохондрии на митофагию. Таким образом, PARK2 и PINK1 участвуют в одном каскаде реакций, который регулирует работу митохондрий и обеспечивают их правильную утилизацию. И, следовательно, дефект хотя бы

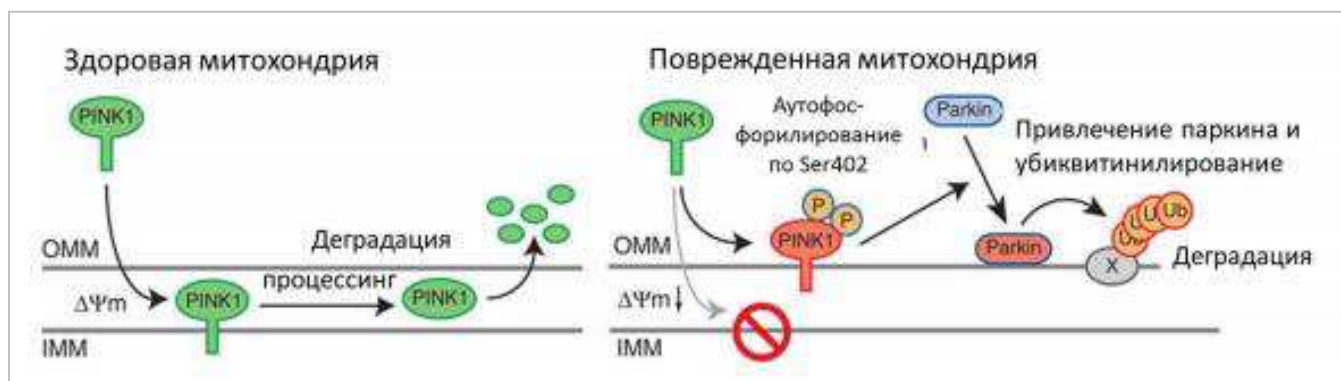


Рисунок 2 - Активация киназы PINK1



одного из участников каскада ведет к накоплению дефектных митохондрий, увеличению продукции активных форм кислорода и, следовательно, к гибели нейронов [35].

#### **1.3.4 Ген PARK7**

Мутации в гене PARK7 (DJ-1) были впервые описаны в двух европейских семьях, но данных о наличии телец Леви у пациентов с БП, вызванной мутациями в этом гене нет. Белок DJ-1 состоит из 189 аминокислот и экспрессируется повсеместно, наиболее сильная экспрессия наблюдается в астроцитах; редко обнаруживается в тельцах Леви у пациентов, страдающих от идиопатической БП. Первым из генов связанных с митохондриальной дисфункцией, характерной для болезни Паркинсона был выявлен ген DJ-1, картированный на хромосоме 1p36. В этом гене выявлено две мутации, приводящие в гомозиготной форме к развитию медленно прогрессирующей ювенильной болезни Паркинсона в сочетании с фокальной дистонией. Первая из этих мутаций - делеция размером 14 т.п.н., захватывающая экзоны 1-5 гена, полностью блокирующая синтез белка. Вторая мутация - миссенс замена L166P - приводит к очень быстрой деградации фермента [36]. Позднее была описана еще одна миссенс мутация в гене DJ-1 - A104T. Она обнаружена у больного из Азии с болезнью Паркинсона с ранним началом развития в гетерозиготном состоянии, и не была выявлена у здоровых лиц. Однако патогенетическое значение данной мутации нельзя считать доказанным. В целом мутации в гене DJ-1 встречаются не более чем у 1% больных с ранней формой болезни Паркинсона.

Конкретная функция DJ-1 не полностью определена, однако, известно, что он является сенсором окислительного стресса и может играть разнообразные роли, от пероксидазы и шаперона до РНК-связывающего белка и участвовать в регуляции состояния митохондрий. Также есть данные о том, что он действует в параллели с путем PINK1/паркин и влияет на митофагию [36].

#### **1.3.5 Ген PARK2**

Ген паркина (PARK2) кодирует белок паркин из 465 аминокислот - цитозольную убиквитин-Е3-лигазу. Основная роль паркина состоит в регуляции митофагии, осуществляемой вместе с митохондриальным белком PINK1 – продуктом еще одного гена аутосомно-рецессивного паркинсонизма (см. рис. 2)

Ген PARK2 состоит из 12 экзонов и его протяженность составляет 500 т.п.н. Белок паркина локализован в комплексе Гольджи и цитозоле нейронов подкорковых ядер головного мозга. Наибольшая концентрация паркина обнаружена в пигментных клетках компактной зоны черной субстанции. Ген PARK2, расположен на хромосоме 6q25.2-27 и связан с развитием особой формы болезни – аутосомно-рецессивной БП, проявляющейся в раннем возрасте. Мутации PARK2 обуславливают около 15% семейных и 4% sporadic случаев БП с дебютом до 40 лет [37]. Мутации этого гена



бывают очень разнообразными – в основном это вставки и делеции экзонов. В настоящее время паркин рассматривается в качестве поливалентного нейропротекторного агента, имеющего ключевое значение для выживания дофаминергических нейронов при воздействии различных нейротоксинов [38]. В связи с тем, что паркин участвует в утилизации поврежденных митохондрий, следует упомянуть о важности этих органелл в жизнедеятельности нейронов. Продукция АТФ в нейронах происходит в основном за счет митохондриального дыхания, роль гликолиза в постмитотических нейронах значительно меньше, чем в глиальных клетках. В ходе митохондриального дыхания производятся активные формы кислорода, и, чем выше интенсивность дыхания, тем их больше. При этом уровень глутатиона в нейронах ниже, чем в астроцитах, что делает их основной мишенью окислительного стресса. Дофаминергические нейроны больше других подтипов нейронов подвержены окислительному стрессу, т.к. окисление и круговорот дофамина сами по себе ингибируют работу комплекса I и повышают тем самым продукцию активных форм кислорода. Показано нарушение работы комплекса I дыхательной цепи митохондрий в нейронах при болезни Паркинсона в постмортальных образцах. Митохондрии «больных» нейронов производят больше активных форм кислорода, чем не мутантные нейроны. Ингибиторы комплекса I ротенон и МРТР вызывают избирательную гибель дофаминергических нейронов и используются для создания моделей болезни Паркинсона на животных. Это подтверждает особую роль митохондриального дыхания и комплекса I в патогенезе болезни Паркинсона.

### **1.3.6 Ген АТР13А2**

Впервые описанный в иорданской семье синдром Куфар-Рейкеба является редкой формой наследственного рецессивного ювенильного паркинсонизма с такими дополнительными симптомами, как пирамидальная дегенерация, восходящий парез зрения и деменция. Локус PARK9, связанный с синдромом Куфар-Рейкеба, локализуется на хромосоме 1p36. Идентификация компаундных гетерозиготных делеций и мутаций сайта сплайсинга у пораженных членов большой чилийской семьи привели к установлению гена-кандидата – АТФазы типа 13А2 (АТР13А2). Этот ген имеет длину 29 т.п.н. и содержит 29 экзонов. В иорданской семье была идентифицирована гомозиготная дупликация 22 п.н. Другие вариации гена - как гетеро-, так и гомозигот-ассоциированные с ранними проявлениями паркинсонизма обнаружены в Бразилии и Италии. Нокдаун ортолога гена АТР13А2 в *Caenorhabditis elegans* неизвестным путем повышает уровень некорректного фолдинга альфа-синуклеина, а ортолог гена АТР13А2 в дрожжах защищает клетки от марганцевых токсинов, указывая на связь между определенными генетическими факторами болезни Паркинсона и факторами риска окружающей среды. Никаких гистопатологических данных, связанных с мутациями в этом гене, получено не было [39].

### 1.3.7 Ген GCH1

Ген GCH1 (ГТФ циклогидролазы 1) состоит из 6 экзонов, располагается на 14 хромосоме и в настоящее время мутации выявлены во всех экзонах гена - причем не обнаружено кластеризации мутаций или частых мутаций. Ген GCH1 связан с выработкой дофамина в головном мозге. Ригидность и потеря мышечной функции у пациентов с паркинсонизмом связана с пониженным уровнем дофамина.

Дофамин играет немаловажную роль в обеспечении когнитивной деятельности. Активация дофаминергической передачи необходима при процессах переключения внимания человека с одного этапа когнитивной деятельности на другой. Таким образом, недостаточность дофаминергической передачи приводит к повышенной инертности больного, которая клинически проявляется замедленностью когнитивных процессов (брадифрения). Данные нарушения являются наиболее типичными когнитивными симптомами болезней с дофаминергической недостаточностью, такими как паркинсонизм (идиопатический и вторичный). Причиной возникновения вторичных форм паркинсонизма являются разные факторы. В зависимости от причины возникновения симптомов выделяют лекарственный паркинсонизм, васкулярный – при инсультах в области скорлупы и черной субстанции; токсический и гипоксический, метаболический, постэнцефалический, опухолевый и паранеопластический, травматический при тяжёлых черепно-мозговых травмах или частой травматизации (энцефалопатия боксёров) [40]. Частым симптомом вторичного паркинсонизма является ригидная дистония. В 1994 г. ген аутосомно-доминантной ригидной дистонии был идентифицирован. Оказалось, что он кодирует синтез одного из ключевых ферментов дофаминового обмена – ГТФ-циклогидролазу 1 (ГЦГ-1, или GCH1). Фермент ГЦГ-1 регулирует превращение ГТФ в дигидронеоптерин-трифосфат; последний, в свою очередь, является субстратом для образования тетрагидробиоптерина (BH4) – кофактора тирозин-гидроксилазы, ответственной за синтез дофамина из тирозина (Рис.3).

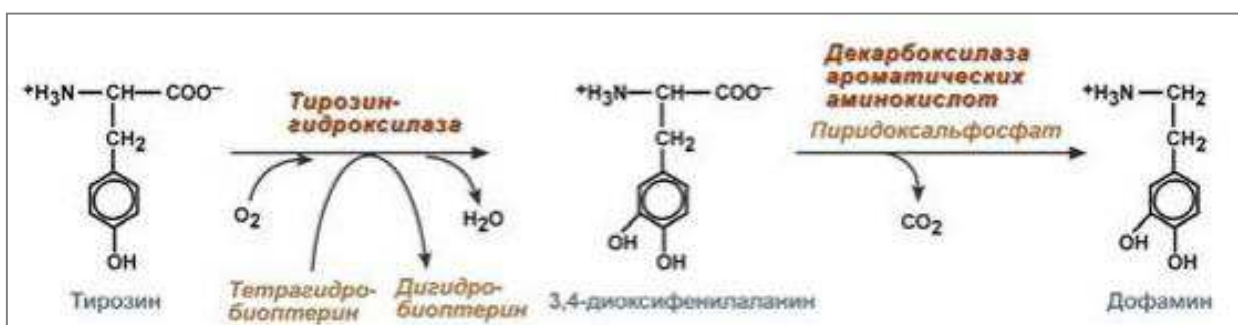


Рисунок 3 - Реакция синтеза дофамина

При наличии мутаций в гене GCH1 нарушается функция данного фермента и весь последующий биохимический каскад, что приводит к недостаточности синтеза дофамина в нейронах черной субстанции [41].

Мутации удается выявить только в 40-50% семейных и спорадических случаев недостаточности фермента, т.к. обычно мутации в гене ГТФ

циклогидролазы-1 приводят к снижению активности фермента до 40-50% от нормы. Но в некоторых случаях (например, при мутации G201E) уровень активности снижается до 20% от нормы.

В исследовании по секвенированию экзома [42] было идентифицировано 11 различных гетерозиготных мутаций, 6 из которых не были описаны ранее. В выборке обследуемых пациентов с диагнозом БП была рассчитана распространенность мутаций в гене GCH1 в сравнение с группой контроля. Частота мутаций в GCH1 была значительно выше в группе пациентов с БП - 0,52%, чем в контроле - 0,15%.

### 1.3.8 Ген UCH-L1

UCH-L1 (Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1) является членом семейства генов, продукты которого гидролизуют небольшие С-концевые аддукты убиквитина с образованием убиквитинового мономера. Экспрессия UCH-L1 высоко специфична для нейронов и клеток диффузной нейроэндокринной системы и их опухолей. Он присутствует в избытке во всех нейронах (составляет 1-2% от общего белка головного мозга), выраженный специфически в нейронах и яичке/яичнике [43]. Каталитическая триада UCH-L1 содержит цистеин в положении 90, аспартат в положении 176 и гистидин в положении 161, которые ответственны за его гидролазную активность.

Точечная мутация I93M, была выявлена и идентифицирована причиной болезни Паркинсона в одной немецкой семье. Хотя это открытие сомнительно, поскольку ни у кого из пациентов с этой мутацией не было обнаружено болезни Паркинсона [44]. Кроме того, было выявлено, что полиморфизм S18Y связан с уменьшением риска развития болезни Паркинсона, т.к. этот полиморфизм повышает антиоксидантную активность. Ряд исследований связывает полиморфный вариант S18Y UCH-L1 с защитой от спорадической болезни Паркинсона. Механизм, участвующий в этой защитной функции, неизвестен, но, как правило, предполагается, что он связан с убиквитин-протеасомной системой [45].

При проведении анализа ряда публикаций по ассоциации мутации S18Y в гене убиквитин карбокситерминальной гидролазы L1 с развитием БП была выявлена статистически значимая обратная связь. В данной работе было проанализировано 1970 пациентов с диагнозом БП и 2224 человека из контрольной группы. Была обнаружена статистически значимая обратная связь S18Y с БП. Носители варианта аллеля Y/Y плюс Y/S против S/S) имели отношение шансов 0,84, тогда как для варианта аллеля Y/Y против S/S плюс Y/S отношение шансов равно 0,71. Обратная связь наиболее очевидна у пациентов в молодом возрасте. Эти данные подтверждают, что UCHL1 является геном, который может являться защитой от БП, а значит является потенциальной мишенью для дальнейших исследований его ассоциации с БП [46]. Однако эти данные не имеют однозначного подтверждения. Доказательством тому является исследование, в котором опровергается то, что мутация S18Y в гене UCHL1 имеет защитные от БП свойства [47].

### 1.3.9 Гены *CAV1* и *CAV2*

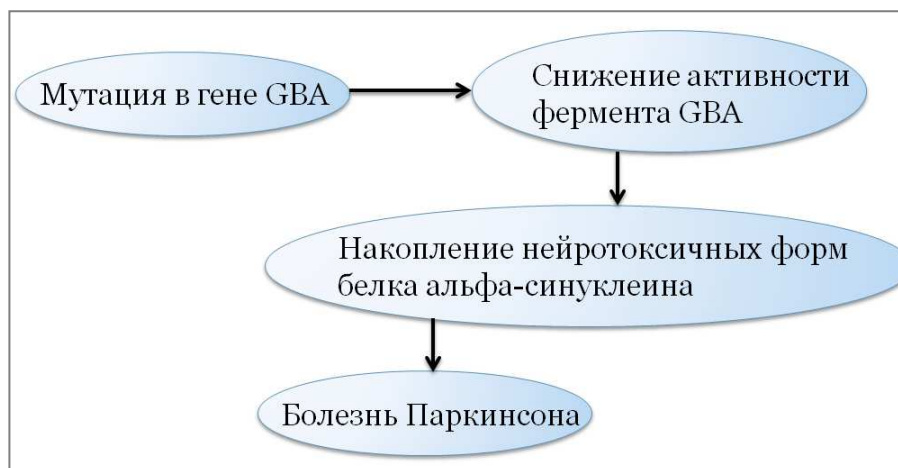
Гены *CAV1* и *CAV2* кодируют белки кавеолины. У позвоночных существует три вида кавеолинов – 1, 2 и 3 соответственно. В клетке кавеолин собирается в олигомеры, связывает холестерин и сфинголипиды в определённых участках клеточной мембраны, что приводит к формированию кавеол. Ген *CAV-1* является кандидатом на ген-супрессор опухоли и отрицательным регулятором каскада митоген-активирующих Ras-киназ. Гены *CAV-1* и *CAV-2* расположены рядом друг с другом на 7 хромосоме и экспрессируют колокализующие белки, образующие кавеолы [48]. Кавеолы участвуют в передаче клеточных сигналов, эндоцитозе, онкогенезе, заражении клетки рядом патогенных бактерий и вирусов [49].

Есть данные о важности кавеолинов при нейродегенеративных болезнях и старении. У мышей одной из причин дегенерации синапсов, связанной со старением, является возрастное снижение экспрессии холестерин-связывающего белка *CAV-1* [50]. Также *CAV-1* был идентифицирован как субстрат для паркина, одного из основных генов, вовлеченных в патогенез БП. Потеря функции паркина как цитозольной убиквитин-Е3-лигазы способствует нарушению убиквитинилирования и деградации *CAV-1*, приводя к накоплению кавеолина-1 и 2 в клетках. Повышенный уровень кавеолина в мембранах клеток приводит к изменению общего уровня холестерина и текучести мембран, что нарушает регуляцию эндоцитоза. Таким образом, это может также явиться фактором, вызывающим развитие БП [51].

### 1.2.10 Ген *GBA*

Ген *GBA* (глюкоцереброзидаза) не так давно начал привлекать внимание ученых и не входит в спектр анализируемых наборами от MRC-Holland генов. Однако это не означает, что его влияние на развитие БП менее значимо. Картина скорее обратная. Мутации в гене глюкоцереброзидазы (*GBA*) являются одними из наиболее распространенных генетических факторов развития болезни Паркинсона (БП). Мутации *GBA* повышают риск развития заболевания в 6–7 раз во всех популяциях [52]. Распространенность формы БП, вызванной мутацией в гене глюкоцереброзидазы в европейских популяциях и в России составляет 4–5% всех случаев заболевания [53]. Гомозиготные мутации в гене *GBA* приводят к развитию болезни Гоше, относящейся к классу лизосомальных болезней накопления с аутосомно-рецессивным типом наследования.

Ген *GBA* состоит из 11 экзонов и кодирует лизосомальный фермент – глюкоцереброзидазу, которая отвечает за утилизацию глюкоцереброзида. В рамках патогенеза БП предполагается, что мутации гена *GBA*, ассоциированные со снижением активности фермента, могут способствовать накоплению глюкоцереброзида в тканях головного мозга, который, в свою очередь, влияет на накопление нейротоксичных форм белка альфа-синуклеина, агрегация которого сегодня рассматривается в качестве центрального звена патогенеза БП (Рисунок 4).



**Рисунок 4 - Механизм развития GBA формы Болезни Паркинсона**

В 2004 году впервые было отмечено, что у близких родственников пациентов с болезнью Гоше значительно повышена заболеваемость БП по сравнению с общей популяцией [54]. В дальнейшем было показано, что как пациенты с болезнью Гоше, так и гетерозиготные носители мутации в гене GBA, подвержены повышенному риску развития БП. И данная ассоциация была многократно подтверждена для всех популяций [55, 56].

В настоящее время в гене GBA описано более 300 мутаций, включающих точковые мутации, делеции, инсерции, мутации сайтов сплайсинга, внутригенные перестройки. Возможно, такой большой набор разнообразных и в одинаковой мере значимых мутаций стал причиной тому, что этот ген не был включен в наборы для MLPA-анализа от MRC-Holland. В различных популяциях описаны мажорные мутации гена. В российской популяции чаще выявляются мутации A1226G (N370S) и T1448C (L444P) среди пациентов с болезнью Гоше, составляя 45 и 23% мутантных аллелей, соответственно [57]. Большинство мутаций в гене GBA не приводят к полному отсутствию ферментативной активности данного лизосомного фермента, но ассоциированы с ее снижением. Так, например, остаточная активность фермента при мутации T1448C (L444P) составляет 5%, при мутации A1226G (N370S) – 13% [58].

Таким образом – ген глюкоцереброзидазы является одной из основных мишеней для исследования генетических аспектов БП, т.к. занимает далеко не последнее место по распространенности у пациентов с БП среди всех популяций, включая Россию.

## **2 Материалы и методы**

### **2.1 Объект исследования**

Объектом исследования являлась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной крови 25 пациентов с БП, поступивших на консультативный прием врача-невролога В.Г.Абрамова в ФГБУ ФСНКЦ ФМБА г.Красноярск. Все пациенты имеют подтвержденный диагноз БП, поставленный врачом-неврологом В.Г. Абрамовым на основании клинических данных и рекомендациями по установлению диагноза Brain Bank [4].

Из 25 пациентов всего 15 женщин и 10 мужчин, в процентном соотношении – 60% и 40% соответственно. Средний возраст всех пациентов –  $52,4 \pm 11,3$  года. Из всех пациентов двое из них имеют между собой родственные связи, а именно, являются матерью и дочерью, поэтому представляют особый интерес, так как у дочери отслеживается раннее начало заболевания – до 40 лет.

Исследование пациентов на наличие мутаций, вовлеченных в патогенез БП, проводили с помощью MLPA-анализа.

### **2.2 Выделение ДНК набором Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit**

Компанией MRC-Holland для надежности результатов MLPA-анализа проверен и рекомендован к использованию набор реагентов для выделения ДНК компании Promega - Promega Wizard Genomic DNA Purification Kit. Выделение ДНК проводили согласно инструкции производителя набора.

Протокол для выделение геномной ДНК из цельной крови (объем образца 300 мкл):

1. Подготовьте чистые пробирки, подпишите их и разлейте по 900 мкл Cell Lysis Solution.

2. Быстро разморозьте (можно прогреть в руке) пробирки с замороженной кровью, аккуратно перемешайте содержимое переворачиванием, отберите аликвоту в 300 мкл в соответствующий приготовленный эпиндорф (см. 1)

3. Перемешать аккуратно содержимое переворачиванием и поставить в штативе на платформу для перемешивания, если нет возможности постоянного мягкого перемешивания, то оставить в штативе и периодически перемешивать переворачиванием ~ 1-2 часа.

4. Открутить в центрифуге 5 мин. При 10 тыс. оборотов. Пробирки установить в центрифугу хвостиком от центра!

5. Аккуратно слить супернатант или удалить отсасывателем, на дне останется осадок, при сливании пробирку держать так, чтобы выливалось через противоположную от хвостика сторону.

6. К осадку добавить еще 500 мкл Cell Lysis Solution, перемешать переворачиванием и еще поставить трястись на 30 мин. – 1 час

7. Повторить п. 4, слить супернатант. Встряхните пробирку до тех пор, пока лейкоциты не растворятся (10-15 секунд)

8. Добавить 300 мкл Nuclei Lysis Solution в пробирку, содержащую ресуспендированные клетки. Перемешать на вортексе, чтобы лизировать

лейкоциты. Раствор должен стать очень вязким. Если после смешивания видны скопления клеток, инкубируйте раствор при 37°C до тех пор, пока не будут разрушены все комки. Если скопления все еще видны через 1 час, добавьте дополнительно 100 мкл Nuclei Lysis Solution и повторите инкубацию.

9. Добавьте 100 мкл Protein Precipitation Solution и перемешайте на вортексе в течение 10-20 секунд. Небольшие белковые глыбы могут быть видны после вортексирования. Примечание: Если на этапе 6 был добавлен дополнительный Nuclei Lysis Solution, добавьте в общей сложности 130 мкл раствора для осаждения протеина для объема проб 300 мкл.

10. Центрифугируйте при 13000-16000 g в течение 3 минут при комнатной температуре. Должен быть виден темно-коричневый белковый осадок

11. Супернатант перенести в чистую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку, содержащую 300 мкл изопропанола комнатной температуры.

12. Аккуратно перемешайте раствор до тех пор, пока белые нитевидные нити ДНК не образуют видимую массу.

13. Центрифугируйте при 13000-16000 g в течение 1 минуты при комнатной температуре. ДНК будет видна в виде белого осадка.

14. Слейте супернатант и добавьте 300 мкл 70% этанола. Осторожно переверните пробирку несколько раз, чтобы растворить осадок ДНК. Повторите центрифугирование также как и в п. 13.

15. Осторожно удалите этанол остасывателем. В этот момент гранулы ДНК очень рыхлые, и поэтому необходимо избегать попадания ДНК в наконечник. Перевернуть пробирку на чистую адсорбирующую бумагу и высушить на воздухе пробирку в течение 10-15 минут.

16. Добавьте 100 мкл DNA Rehydration Solution в пробирку и гидратируйте ДНК, инкубируя при 65°C в течение 1 часа. Периодически смешивайте раствор, осторожно постукивая по пробирке. Также можно регидратировать ДНК путем инкубации раствора в течение ночи при комнатной температуре или при 4°C.

17. Храните ДНК при 2-8°C.

После выделения ДНК необходимым шагом являлось измерение ее концентрации, т.к. для МЛРА-анализа существуют рамки допустимой концентрации ДНК, добавляемой в анализируемую пробу. Необходимая концентрация ДНК составляет от 50 до 250нг, но оптимальное количество ДНК определяется в диапазоне 50-100нг.

### **2.3 Измерение концентрации ДНК**

В образец вводится флуоресцентный зонд, который специфически связывает целевую молекулу, образуя флуоресцентный комплекс. Источник света возбуждает флуоресценцию, которая пропорциональна концентрации определяемого вещества. Прибор измеряет интенсивность свечения и рассчитывает концентрацию.

Измерение концентрации ДНКс использованием набора реагентов Quant-iT™ hsDNA AssayKit и флуориметраQubit (Invitrogen) производилось согласно следующей методике:

Разморозить все реагенты при комнатной температуре.

1. Наставить пробирки на 0,5 мл в количестве (n), равном числу образцов ДНК плюс 2 стандарта. Подписать на крышечках номера образцов и стандартов.

2. Приготовить Рабочую смесь: 1×n мкл Реагента + 199×n мкл буфера

3. Раскапать в пробирки:

а) для стандартов 190 мкл Рабочей смеси + 10 мкл Стандарта;

б) для исследуемых образцов: 199 – 180 мкл Рабочей смеси + 1 – 20 мкл ДНК

4. Вortexировать 2 – 3 сек, сбросить капли.

5. Инкубировать 2 мин.

6. Включить Qubit в сеть. Если прибор находится в спящем режиме, нажать любую кнопку для перехода в рабочий режим.

7. Выбрать вид анализа (ssDNA HS Assay), используя кнопки ↑ и ↓. Нажать GO.

8. Произвести калибровку:

а) Выбрать старую калибровку – Use last calibration. Нажать GO.

ИЛИ

б) Произвести калибровку заново:

- вставить Стандарт №1, нажать GO;

- вставить Стандарт №2, нажать GO.

9. Вставить исследуемую пробу, нажать GO. На экране появится число.

10. Записать результат.

11. Убрать исследуемую пробу из прибора, вставить следующую и нажать GO.

## 2.4 Методика проведения MLPA-анализа

Весь MLPA-анализ можно условно разделить на 6 основных этапов: денатурация, гибридизация, лигазная реакция, ПЦР-амплификация

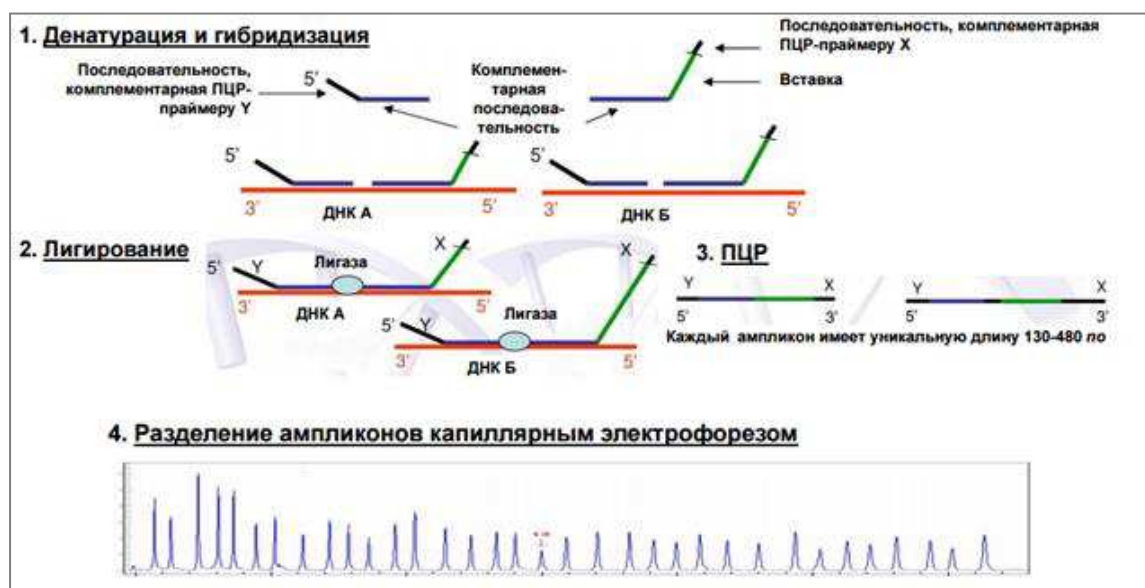


Рисунок 4 - MLPA-анализ



гибридизовавшихся ДНК-зондов, электрофоретическая детекция результатов с помощью фрагментного анализа, количественный анализ данных с помощью программного обеспечения Coffalyzer.Net.

В общих чертах метод представляет собой разновидность мультиплексной ПЦР, в результате которой амплифицируются несколько различных участков ДНК только с одной парой праймеров, комплементарных зондам. Преимущество метода в том что, одновременно возможно проводить анализ нескольких участков ДНК (до 50 зондов). Каждый зонд имеет уникальную длину, так что полученные ампликоны можно разделить и идентифицировать путем капиллярного электрофореза. Сравнивая значения сигналов, полученных для исследуемого образца, с данными, полученными для референсных образцов, можно определить относительное количество каждого ампликона (Рисунок 4).

Данный метод анализа является высокоточным и позволяет детектировать различия в целевом участке ДНК всего в один нуклеотид. Проводить методику фрагментного анализа возможно на секвенаторе с функцией капиллярного электрофореза.

Методика MLPA-анализа проводится в течение двух дней. Программа для термоциклера (Рисунок 5) выглядит следующим образом:

1) ДНК денатурация			
1.	98°C	5 минут	
2.	25°C	пауза	
2) Реакция гибридизации			
3.	95°C	1 минута	
4.	60°C	пауза	
3) Реакция лигирования (спивания)			
5.	54°C	пауза	
6.	54°C	15 минут	
7.	98°C	5 минут	
8.	20°C	пауза	
4) ПЦР реакция			
9.	35 циклов		
		•	95°C 30 секунд
		•	60°C 30 секунд
		•	72°C 60 секунд
10.	72°C	20 минут	
11.	15°C	пауза	

**Рисунок 5 – Протокол MLPA-реакций для амплификатора**

Так как методика не простая и состоит из нескольких этапов, имеет смысл рассмотреть все этапы подробнее.

#### 1. Денатурация и гибридизация.

Выделенная ДНК подвергается денатурации и гибридизации со специфичными для исследуемых генов олигонуклеотидными зондами. Каждый зонд состоит из двух частей, которые гибридизуются на таргетной ДНК таким образом, что между ними остается «пробел» в один нуклеотид. Каждая из двух частей зонда содержит последовательность, комплементарную одному из пары

универсальных праймеров. Для наиболее значимых генов тест-система содержит несколько зондов, комплементарных разным участкам этого гена. Это позволяет значительно увеличить надежность получаемых результатов. Все реакции протекают в стандартной ПЦР-пробирке, находящейся в термоциклере.

## 2. Лигирование.

После 16—20 ч гибридизации в реакцию добавляют лигазную смесь, которая содержит в себе фермент — лигазу. Она «сшивает» две половины каждого зонда между собой. Данная реакция увеличивает специфичность теста, поскольку лигазная реакция может пройти только в том случае, когда две половины зонда гибридизовались строго специфично и находятся рядом с расстоянием в один нуклеотид.

## 3. ПЦР.

Затем в реакцию вносится ПЦР-смесь, которая содержит пару универсальных праймеров, меченных флюоресцентной меткой. Происходит экспоненциальное накопление ПЦР-продуктов, которые являются копиями имеющихся в реакции лигированных зондов, т.е. в ПЦР участвует не выделенная (исследуемая) ДНК, а гибридизовавшиеся на ней зонды. Такой модификацией и достигается высокая мультиплексность данного метода. Количество ПЦР-продуктов зависит от числа гибридизовавшихся на анализируемой ДНК зондов, а значит и числа исследуемых генов в данном образце. Амплификация возможна только при успешной гибридизации обеих половин зонда и их лигировании, поскольку только в этом случае на концах лигированного зонда находятся участки, комплементарные универсальным праймерам. Если лигазная реакция не прошла, то имеется участок комплементарный только одному из праймеров. Такой зонд не может быть экспоненциально амплифицирован в ходе ПЦР и, следовательно, не сможет дать, достаточный для детекции, флюоресцентный сигнал.

## 4. Фрагментный анализ.

По завершению ПЦР проводится детекция результатов при помощи капиллярного электрофореза. В ПЦР участвовала только одна пара праймеров. Таким образом были получены аппликаны разной длины. Каждый продукт имеет уникальную длину. Это обеспечено производителем тест-системы путем введения уникальной по длине «вставки» — последовательности ДНК, которую внедрили в зонды между его специфичной для гена последовательностью и последовательностью, комплементарной одному из праймеров. Ввиду разной длины вставки для разных генов получаемые ПЦР-продукты разнятся по длине и легко разделяются при капиллярном электрофорезе.

## 5. Количественный анализ данных.

На заключительном этапе происходит количественный анализ флюоресценции проб. Интенсивность флюоресценции исследуемых генов сравнивается с интенсивностью флюоресценции «референсных» генов (гены, которые при БП не подвергаются количественным нарушениям). Референсные гены также включены в анализ производителем. Вычисляя отношение интенсивностей флюоресценции — исследуемый ген/референсный ген —

делается вывод о наличии/отсутствии численных нарушений (дубликации/делеции) анализируемых генов в исследуемом образце. Данный количественный анализ проводится с помощью программного обеспечения, разработанного именно для анализа результатов MLPA-анализа.

## 2.5 Анализ результатов с помощью программного обеспечения Coffalyser.Net

Coffalyser.Net - это бесплатное программное обеспечение для анализа MLPA результатов (Рисунок 6). Оно совместимо с файлами, производимыми всеми основными системами капиллярного электрофореза. Анализ MLPA выполняется в два шага:

- Анализ фрагментов ДНК
- Сравнительный анализ образцов

В программе присутствует автоматическая проверка качества образцов и качества выполненных реакций.

	sample name	sample type	bin smpl	FRSS	FMRS	probes	DNA	DD	X	Y	Pos
1	66	reference	<input type="checkbox"/>			49/49-50					D10
2	67	reference	<input type="checkbox"/>			49/49-50					F10
3	68	reference	<input type="checkbox"/>			49/49-50					E10
4	70	sample	<input type="checkbox"/>			49/49-50					C10
5	846	sample	<input type="checkbox"/>			49/49-50					G10
6	KEV	sample	<input type="checkbox"/>			49/49-50					A10
7	KOA	sample	<input type="checkbox"/>			49/49-50					B10
8	SD	positive reference	<input checked="" type="checkbox"/>			50/49-50					H10

Рисунок 6 – Рабочая панель анализа данных программы Coffalyser.Net

Прежде чем начать анализировать данные, программное обеспечение должно быть подготовлено в несколько шагов, которые имеют решающее значение для успешного анализа данных. После подготовки к анализу каждый исследуемый образец будет сравниваться с каждым референсным образцом, чтобы привести эти данные в общий масштаб. Для этого применяются несколько методов нормализации, включая статистическое сопоставление распределения каждого образца с доступными типами групп выборок.

### **3 Результаты и обсуждения**

Из текста бакалаврской работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иллариошкин, С. Н. Современные представления об этиологии болезни Паркинсона / С. Н. Иллариошкин // Неврологический журнал. – 2015 – Т. 20, №4. – С. 4–13.
2. Садоха, К. А. Болезнь Паркинсона: некоторые аспекты патогенеза и эффективное лечение / К. А. Садоха, Е. В. Мазуренко // Медицинские новости. – 2012. – №. 10. – С. 5-11.
3. Stoessel D. Promising Metabolite Profiles in the Plasma and CSF of Early Clinical Parkinson's Disease / D. Stoessel [et al.] // *Frontiers in aging neuroscience*. – 2018. – Vol. 10. – P. 51-55.
4. Hughes A. J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases / A. J. Hughes [et al.] // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 1992. – Vol. 55, №. 3. – P. 181-184.
5. Иллариошкин, С. Н. Паркинсонизм с ранним началом / С. Н. Иллариошкин // *Атмосфера. Нервные болезни*. – 2006. – №3. – С.14-18.
6. Филатова, Е. В. Анализ однонуклеотидного полиморфизма RS415430 в гене WNT3 в российской популяции при болезни Паркинсона / Е. В. Филатова [и др.] // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2011. – №. 2. – С. 3-4.
7. Голимбет, В. Е. Вариации числа копий в геноме—новая страница в генетических исследованиях в области психиатрии: международный проект PsychCNVs / В. Е. Голимбет, Е. В. Корень // *Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова*. – 2010. – Т. 110, №. 1. – С. 107-109.
8. Шадрина, М. И. Технология ДНК-биочипов в анализе генетических маркеров болезни Паркинсона / М.И. Шадрина, Е.В. Филатова, Т. Никопенсиус // *Болезнь Паркинсона и расстройства движений*. – М. 2013
9. Шнайдер, Н. А. Современные представления о генетике болезни Паркинсона / А. Н. Шнайдер, М. Р. Сапронова // *Вестник Клинической больницы № 51*. – 2011. – Т. 4, №. 2. – С. 96-99.
10. Левин, О. С. Эпидемиология болезни Паркинсона / О. С. Левин [и др.] // *Болезни движений: медицинские и социальные аспекты: материалы международной научной конференции: АПК и ППРО*. – Москва. – 2010. – С. 23-29.
11. Яхно, Н. Н. Эффективность и переносимость препарата Сталево при болезни Паркинсона / Н. Н. Яхно, М. Р. Нодель, Н. В. Федорова // *Неврологический журнал*. – 2007. – Т. 12, №. 6. – С. 48-52.
12. Иллариошкин, С. Н., Современные возможности идентификации латентной стадии нейродегенеративного процесса / С. Н. Иллариошкин, А. Г. Власенко, Е. Ю. Федотова // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2013. – Т. 7, №. 2. – С. 101-106.
13. Saiki, S. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update / S. Saiki, S. Sato, N. Hattori // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 2011. – Vol. 83. – P. 430-436.

14. Gorell, J. M. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living / J. M. Gorell [et al.] // *Neurology*. – 1998. – Vol. 50, №. 5. – P. 1346-1350.
15. Forster, E. Paralysis agitans / E. Forster, F. H. Lewy // *Pathologische Anatomie. Handbuch der Neurologie*. – 1912. – Vol. 20. – P. 920-933.
16. Tredici, K. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease / K. Del Tredici, H. Braak // *Movement Disorders*. – 2012. – Vol. 27, №. 5. – P. 597-607.
17. Olanow, C. W. Parkinson's disease, proteins, and prions: milestones / C. W. Olanow, K. McNaught // *Movement Disorders*. – 2011. – Vol. 26, №. 6. – P. 1056-1071.
18. Иллариошкин, С. Н. Генетические аспекты болезни Паркинсона / С. Н. Иллариошкин [и др.] // *Неврологический журнал*. – 2002. – Т. 7, №. 5. – С. 47-51.
19. Mizuno, Y. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease / Y. Mizuno [et al.] // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2008. – Vol. 363, №. 1500. – P. 2215-2227.
20. Oeda, T. Impact of glucocerebrosidase mutations on motor and nonmotor complications in Parkinson's disease / T. Oeda [et al.] // *Neurobiology of aging*. – 2015. – Vol. 36, №. 12. – P. 3306-3313.
21. Malec-Litwinowicza, M. Cognitive impairment in carriers of glucocerebrosidase gene mutation in Parkinson disease patients / M. Malec-Litwinowicza [et al.] // *Neurol. Neurochir. Polska*. – 2014. – Vol. 48. – P. 258-261.
22. Иллариошкин, С. Н. Гетерогенность спорадической болезни Паркинсона: молекулярный подход к решению проблемы / С. Н. Иллариошкин [и др.] // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2007. – Т. 1, №. 1. – С. 86-92.
23. Cookson, M. R. Cell systems and the toxic mechanism (s) of  $\alpha$ -synuclein / M. R. Cookson, M. van der Brug // *Experimental neurology*. – 2008. – Vol. 209, №. 1. – P. 5-11.
24. Пчелина, С. Н. Альфа-синуклеин как биомаркер болезни Паркинсона / С. Н. Пчелина // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2011. – Т. 5, №. 4. – С. 115-120.
25. Polymeropoulos, M. H. Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease / M. H. Polymeropoulos [et al.] // *Science*. – 1997. – Vol. 276, №. 5321. – P. 2045-2047.
26. Miller, D. W.  $\alpha$ -synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication / D. W. Miller [et al.] // *Neurology*. – 2004. – Vol. 62, №. 10. – P. 1835-1838.
27. Chen, Y. A. SNARE-mediated membrane fusion / Y. A. Chen, R. H. Scheller // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2001. – Vol. 2, №. 2. – P. 98-101.
28. Feany, M. B. Drosophila model of Parkinson's disease / M. B. Feany, W. W. Bender // *Nature*. – 2000. – Vol. 404, №. 6776. – P. 394-398.

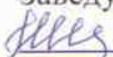
29. Funayama, M. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2–q13.1 / M. A. Funayama, K. Hasegawa, H. Kowa // *Annals of neurology*. – 2002. – Vol. 51, №. 3. – P. 296-301.
30. Lesage, S. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs / S. Lesage, A. Dürr, M. Tazir // *New England Journal of Medicine*. – 2006. – Vol. 354, №. 4. – P. 422-423.
31. Winslow, A. R.  $\alpha$ -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease / A. R. Winslow [et al.] // *The Journal of cell biology*. – 2010. – Vol. 190, №. 6. – P. 1023-1037.
32. Пчелина, С. Н. Молекулярные основы болезни Паркинсона, обусловленной мутациями в гене LRRK2 / С. Н. Пчелина, А. К. Емельянов, Т. С. Усенко // *Молекулярная биология*. – 2014. – Т. 48, №. 1. – С. 3-4.
33. Qing, H. Lrrk2 phosphorylates alpha synuclein at serine 129: Parkinson disease implications / H. Qing [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2009. – Vol. 387, №. 1. – P. 149-152.
34. Valente, E. M. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism / E. M. Valente [et al.] // *Annals of neurology*. – 2004. – Vol. 56, №. 3. – P. 336-341.
35. Лебедева, О.С. Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования: дис. канд. биол. наук: 03.02.07 / Лебедева Ольга Сергеевна. – Москва, 2016. – 181 с.
36. Bonifati, V. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism / V. Bonifati [et al.] // *Science*. – 2003. – Vol. 299, №. 5604. – P. 256-259.
37. Зарубина, И. В. Функционально-метаболические нарушения в головном мозге при хронической ишемии и их коррекция нейропептидами / И. В. Зарубина, Т. В. Павлова // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2007. – Т. 5, №. 2. – С. 26-29.
38. Lim, K. L. Mitochondrial dynamics and Parkinson's disease: focus on parkin / K. L. Lim [et al.] // *Antioxidants & redox signaling*. – 2012. – Vol. 16, №. 9. – P. 935-949.
39. Schneider, S. A. ATP13A2 mutations (PARK9) cause neurodegeneration with brain iron accumulation / S. A. Schneider [et al.] // *Movement Disorders*. – 2010. – Vol. 25, №. 8. – P. 979-984.
40. Шток, В. Н. Экстрапирамидные расстройства / В. Н. Шток, О.С. Левин, Н. В. Федорова // *Руководство по диагностике и лечению: Медпресс-информ*. – Москва. – 2002. – С. 125-51.
41. Иванова-Смоленская, И. А. Молекулярно-генетический анализ дистонических синдромов в российских семьях / И. А. Иванова-Смоленская [и др.] // *Болезнь Паркинсона и расстройства движений*. – 2008. – Т. 12. – С. 64-68.
42. Mencacci, N. Mutations in the GCH1 Gene Are Associated with Parkinson Disease / N. Mencacci [et al.] // *Neurology*. – 2014. – Vol. 82, №. 10. – P. 17-23.

43. Doran, J. F. Isolation of PGP 9.5, a New Human Neurone-Specific Protein Detected by High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis / J. F. Doran [et al.] // *Journal of neurochemistry*. – 1983. – Vol. 40, №. 6. – P. 1542-1547.
44. Leroy, E. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease / E. Leroy [et al.] // *Nature*. – 1998. – Vol. 395, №. 6701. – P. 451-459.
45. Kyratzi, E. The S18Y polymorphic variant of UCH-L1 confers an antioxidant function to neuronal cells / E. Kyratzi, M. Pavlaki, L. Stefanis // *Human molecular genetics*. – 2008. – Vol. 17, №. 14. – P. 2160-2171.
46. Maraganore, D. M. UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene / D. M. Maraganore [et al.] // *Annals of neurology*. – 2004. – Vol. 55, №. 4. – P. 512-521.
47. Healy, D. G. UCHL-1 is not a Parkinson's disease susceptibility gene / D. G. Healy [et al.] // *Annals of neurology*. – 2006. – Vol. 59, №. 4. – P. 627-633.
48. Lajoie, P. Regulation of raft-dependent endocytosis / P. Lajoie, I. R. Nabi // *Journal of cellular and molecular medicine*. – 2007. – Vol. 11, №. 4. – P. 644-653.
49. Anderson, R. G. W. The caveolae membrane system / R. G. W. Anderson // *Annual review of biochemistry*. – 1998. – Vol. 67. – P. 199-225.
50. Trushina, E. Mutant huntingtin inhibits clathrin-independent endocytosis and causes accumulation of cholesterol in vitro and in vivo / E. Trushina, [et al.] // *Human molecular genetics*. – 2006. – Vol. 15, №. 24. – P. 3578-3591.
51. Cha, S. H. Loss of parkin promotes lipid rafts-dependent endocytosis through accumulating caveolin-1: implications for Parkinson's disease / S. H. Cha [et al.] // *Molecular neurodegeneration*. – 2015. – Vol. 10, №. 1. – P. 63-68.
52. Wang, C. Clinical profiles of Parkinson's disease associated with common leucine-rich repeat kinase 2 and glucocerebrosidase genetic variants in Chinese individuals / C. Wang [et al.] // *Neurobiology of aging*. – 2014. – Vol. 35, №. 3. – P. 725-727.
53. MacDermot, K. Glucocerebrosidase mutations influence the natural history of Parkinson's disease in a community-based incident cohort / K. MacDermot [et al.] // *Current Medical Literature*. – 2013. – Vol. 11, №. 3. – P. 91-95.
54. Goker-Alpan, O. Parkinsonism among Gaucher disease carriers / O. Goker-Alpan // *Journal of medical genetics*. – 2004. – Vol. 41, №. 12. – P. 937-940.
55. Rosenbloom, B. The incidence of Parkinsonism in patients with type 1 Gaucher disease: data from the ICGG Gaucher Registry / B. Rosenbloom [et al.] // *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. – 2011. – Vol. 46, №. 1. – P. 95-102.
56. Lindqvist, D. Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease—associations with depression, fatigue, and cognitive impairment / D. Lindqvist [et al.] // *Brain, behavior, and immunity*. – 2013. – Vol. 33. – P. 183-189.
57. Букина, Т. М. Биохимическая и молекулярно-генетическая диагностика болезни Гоше / Т. М. Букина [и др.] // *Медицинская генетика*. – 2005. – Т. 4, №. 4. – С. 61-62.
58. Пчелина, С. Н. Молекулярные механизмы болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене глюкоцереброзидазы (GBA) / С. Н.



Пчелина [и др.] // Болезнь Паркинсона и расстройства движений. – 2017. – №. 16. – С. 46-51.

Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра медицинской биологии


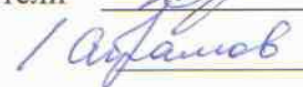
УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
 Е. И. Шишацкая

« 19 » июня 2018 г.

## БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Использование молекулярно-генетических методов для оценки риска раннего  
развития нейродегенеративных заболеваний

Научные руководители  доцент, к.б.н., Т.Н. Субботина,  
 врач-невролог В.Г. Абрамов

Выпускник



Е.А. Серова

Красноярск 2018