

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«**СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой

_____ _____
подпись инициалы, фамилия
« ____ » _____ 20__ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ мутаций в генах, ассоциированных с развитием болезни Паркинсона, у
пациентов Красноярского края

тема

06.04.01 – Биология

06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Руководители	_____	<u>доцент, канд. биол. наук</u>	Т.Н. Субботина
	подпись, дата	должность, ученая степень	
	_____	<u>врач-невролог</u>	В.Г. Абрамов
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Выпускник	_____		А.А. Шалёва
	подпись, дата		
Рецензент	_____	<u>профессор, д-р. мед. наук</u>	Д.В. Похабов
	подпись, дата	должность, ученая степень	

Красноярск 2023

АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Анализ мутаций в генах, ассоциированных с развитием болезни Паркинсона, у пациентов Красноярского края» содержит 40 страниц текстового документа, 4 иллюстрации, 3 таблицы и 44 использованных источника.

БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА, MLPA АНАЛИЗ, АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧНАЯ ПЦР, СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПО СЭНГЕРУ, МУТАЦИИ, *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1*, *ATP13A2*, *LRRK2*.

Цель исследования – анализ мутаций в генах *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1*, *ATP13A2* и *LRRK2* методом MLPA-анализа среди пациентов Красноярского края с диагнозом болезнь Паркинсона (БП).

Исходя из поставленной цели, были сформулированы следующие задачи:

1. Проанализировать ДНК 76 пациентов с диагнозом БП методом MLPA с помощью набора реагентов SALSA MLPA P051 Parkinson mix 1 (MRC-Holland).
2. Разработать анализ мутаций p.G2019S, p.R1441G и p.R1441C в гене *LRRK2* методом аллель-специфичной ПЦР-РВ и проанализировать ДНК 76 пациентов с диагнозом БП.
3. Разработать анализ мутаций p.G2019S, p.R1441G и p.R1441C в гене *LRRK2* методом секвенирования по Сэнгеру.
4. Описать полученные результаты.

Актуальность диссертационной работы заключается в том, что БП является мультифакторным заболеванием, для которого на сегодняшний день не изучены полностью причины и механизмы развития, а также не решена проблема своевременной диагностики. Показано, что мутации в некоторых генах достоверно ассоциированы с развитием семейных форм БП, а также могут являться причиной и спорадических случаев заболевания, однако распространенность данных мутаций в российской популяции, и в частности в Красноярском крае, изучена слабо. Вместе с тем, информация о частоте

встречаемости различных причинных мутаций среди пациентов с БП в конкретных регионах страны, в том числе и в Красноярском крае, необходима как в рамках фундаментального исследования патогенеза БП, так и для генетического консультирования пациентов и их родственников.

В ходе работы было проанализировано 76 пациентов с БП на наличие мутаций в генах *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1*, *ATP13A2* и *LRRK2*, а также обследованы 3 дочери пациента с семейной формой заболевания, у которого была выявлена мутация p.G2019S в гене *LRRK2*. Анализ вышеперечисленных генов проводился методом мультиплексной лигазной реакции с амплификацией (MLPA), наличие мутации подтверждалось методом секвенирования по Сенгеру. Собранный анамнез и генетическое обследование данной семьи согласуются с литературными данными о том, что фенотипически форма *LRRK2*-БП схожа с идиопатической формой БП (иБП) и не имеет уникальных клинических особенностей течения. Выявленная частота встречаемости мутаций в гене *LRRK2* среди пациентов с БП в данном исследовании (1,3%) соответствует таковой среди пациентов с БП в европейских популяциях (1 – 4%). Также был проведен скрининг мутаций p.G2019S, p.R1441G и p.R1441C в гене *LRRK2* методом аллель-специфичной ПЦР-РВ для данных 76 пациентов, мутации p.R1441G и p.R1441C выявлены не были, мутация p.G2019S была подтверждена только для ранее упомянутого пациента и не выявлена ни у кого более. Таким образом, по результатам представленного исследования можно заключить, что для пациентов с БП Красноярского края распространенность мутаций в генах *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1* и *ATP13A2*, вероятно, крайне низка (в данной работе равна нулю), а для гена *LRRK2* скрининг мутации p.G2019S среди пациентов с БП вполне можно считать актуальным.

ОГЛАВЛЕНИЕ

АВТОРЕФЕРАТ	2
ОГЛАВЛЕНИЕ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Болезнь Паркинсона: распространенность, симптомы, патогенез	8
1.2 Гены, вовлеченные в патогенез БП	12
1.2.1 Ген <i>SNCA</i>	13
1.2.2 Ген <i>PARK2</i>	13
1.2.3 Ген <i>PINK1</i>	14
1.2.4 Ген <i>DJ1 (PARK7)</i>	14
1.2.5 Ген <i>ATP13A2</i>	15
1.2.6 Ген <i>LRRK2</i>	15
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	19
2.1 Предмет исследования	19
2.2 Выделение ДНК с помощью набора реагентов Wizard Genomic DNA Purification Kit («Promega»)	20
2.3 Измерение концентрации выделенной ДНК	22
2.4 Проведение МЛРА-анализа	22
2.5 Секвенирование по Сенгеру	25
2.5.1 Проведение первой ПЦР	25
2.5.2 Детекция продуктов первой ПЦР	25
2.5.3 Чистка продуктов ПЦР реагентом ExoSAP-IT	26
2.5.4 Проведение секвенирующей ПЦР	27
2.5.5 Очистка продуктов секвенирующей ПЦР изопропиловым спиртом и запуск капиллярного электрофореза	27
2.6 Аллель-специфичная ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени	28

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	30
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	32
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	33
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	34

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – тяжелое хроническое нейродегенеративное заболевание, одно из наиболее распространенных в своей группе. Считается, что в большинстве случаев БП является результатом сложного взаимодействия между множеством различных генетических факторов и факторов окружающей среды, хотя существуют и моногенные формы заболевания. На сегодняшний день известно около 20 генов, ассоциированных с повышенным риском развития заболевания, при этом однозначно доказано, что 5 из них ответственны за развитие менделирующих форм заболевания, это гены *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1* и *LRRK2* [1]. Для анализа мутаций в причинных генах паркинсонизма используются различные методы, в том числе для скрининга наиболее распространенных изменений некоторых генов или их отдельных экзонов с помощью метода MLPA (мультиплексной лигазной реакции с амплификацией) были разработаны коммерческие наборы.

Целью данной работы стал анализ мутаций в генах *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1*, *ATP13A2* и *LRRK2* методом MLPA-анализа среди пациентов Красноярского края с диагнозом болезнь Паркинсона (БП).

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Проанализировать ДНК 76 пациентов с диагнозом БП методом MLPA с помощью набора реагентов SALSA MLPA P051 Parkinson mix 1 (MRC-Holland).
2. Разработать анализ мутаций p.G2019S, p.R1441G и p.R1441C в гене *LRRK2* методом аллель-специфичной ПЦР-РВ и проанализировать ДНК 76 пациентов с диагнозом БП.
3. Разработать анализ мутаций p.G2019S, p.R1441G и p.R1441C в гене *LRRK2* методом секвенирования по Сэнгеру.
4. Описать полученные результаты.

Работа проведена на базе Научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований СФУ, расположенной на базе ФГБУ ФСНКЦ ФМБА России.

Исследование выполнялось при финансовой поддержке Сибирского федерального университета, а также ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр ФМБА России» в рамках государственного задания на 2017-2021 г.г. по теме: «Использование молекулярно-генетического анализа для оценки риска раннего развития нейродегенеративных заболеваний».

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Болезнь Паркинсона: распространенность, симптомы, патогенез

Болезнь Паркинсона (БП) является распространенным нейродегенеративным заболеванием, частота встречаемости среди лиц старше 60 лет составляет 1-2%, около 17% случаев заболевания обнаруживается до 50 лет, то есть поражается трудоспособная часть населения, что является важной экономической и социальной проблемой [2]. Развитие двигательных симптомов БП (ригидность мускулатуры, тремор, брадикинезия, нарушение позы) коррелирует с гибелью дофаминергических нейронов черной субстанции (ЧС) головного мозга, которая приводит к падению концентрации дофамина в стриатуме. Симптомы БП проявляются при гибели более 50% дофаминергических нейронов ЧС мозга человека, в связи с чем одной из главных проблем, связанных с БП, на сегодняшний день является своевременная диагностика заболевания [3]. Таким образом, современная медицина вынуждена ограничиваться симптоматической и заместительной терапией. Хотя большинство случаев БП являются спорадическими, около 15% больных имеют семейную форму.

Причины и механизм развития БП на сегодняшний день изучены не до конца. В 1980-х годах БП в первую очередь рассматривалась как заболевание дофаминергических нейронов черной субстанции, в котором важную роль играли митохондриальная дисфункция и токсины окружающей среды. За последние 20 лет достижения в области молекулярной генетики и невропатологии привели к лучшему пониманию патофизиологии заболевания. В настоящее время хорошо установлено, что БП не ограничивается поражением черной субстанции, а является системным заболеванием, и что формирование нейротоксичных агрегатов белка α -синуклеина играет важную роль в прогрессировании заболевания. Однако несмотря на то, что α -синуклеин играет важную роль в развитии БП, он не может сам по себе объяснить весь патологический процесс. Недавние открытия подтверждают важную роль

системного воспаления и эндосомно-лизосомных сигнальных путей. В 1912 году, после тщательного патологоанатомического исследования мозга 85 пациентов с БП, Фридрих Х. Леви описал включения, носящие теперь его имя. Леви идентифицировал эозинофильные включения в телах клеток и расширениях нейронов, в нескольких ядрах мозга, таких как моторное дорсальное ядро блуждающего нерва, базальное ядро Мейнерта, бледный шар и таламус, но, что удивительно, не в черной субстанции [4]. Константин Триетакофф, помимо депигментации черной субстанции, впервые описал наличие внутринейрональных включений в выживших черных нейронах. Поскольку эти включения были полностью аналогичны включениям, описанным Фридрихом Леви несколькими годами ранее, Триетакофф предложил назвать их «тельцами Леви и нейритами» [5]. В 1991 г. всесторонний обзор патофизиологии БП показал, что «даже если нельзя исключить генетический компонент в некоторых из ювенильных форм, наследственность, по-видимому, не играет важной роли в развитии болезни» [6]. Это предположение было подтверждено несколькими исследованиями близнецов, показавшими низкую конкордантность БП как у монозиготных, так и у дизиготных близнецов [7, 8]. Наиболее распространенным в то время сценарием было то, что токсические факторы и факторы окружающей среды были ключевыми в развитии болезни.

Интересно, что было выявлено несколько пестицидов, вызывающих паркинсонизм у животных, и эпидемиологические исследования связывают воздействие некоторых из этих пестицидов или гербицидов с повышенным риском последующего развития болезни Паркинсона [9]. Одним из таких пестицидов, который был связан с БП в эпидемиологических исследованиях, является паракват [10]. Паракват – один из наиболее широко используемых гербицидов в мире. Введение параквата крысам вместе с фунгицидом манебом (этиленпиститиокарбаматом марганца) вызывает специфическую дегенерацию нигро-полосатого пути. Еще один гербицид, который привлек внимание как имеющий эпидемиологическую связь с повышенным риском развития болезни

Паркинсона – это ротенон [9]. Ротенон – это природный высоколипофильный токсин, содержащийся в корне растений дерриса и лончокарпа, который широко используется в качестве спрея для пестицидов, а также для уничтожения рыб в озерах и водохранилищах. При системном введении крысам ротенон вызывает двигательную дисфункцию и потерю нейронов вместе с аномальными внутриклеточными включениями в черной субстанции и полосатом теле [11].

В черной субстанции больных БП митохондриальный дефект был впервые обнаружен в 1989 году [12]. Эти результаты были расширены с годами, и в целом существующие исследования показывают, что имеется около 35% дефицита комплекса I черной субстанции при БП [13]. Что касается продукции активных форм кислорода, то посмертный анализ ткани головного мозга показал, что снижение активности комплекса I в ЧС сопровождалось маркерами окислительного стресса, включая окисление липидов и белков. В целом эти наблюдения, которые убедительно свидетельствуют о критическом участии митохондриальной дисфункции и окислительного стресса в развитии БП, занимали центральное место до конца 1990-х годов, когда они были вытеснены потенциальной ролью α -синуклеина в развитии и прогрессировании болезни. α -синуклеин – небольшой белок, присутствующий по большей части в пресинаптических терминалях. Он является основной составляющей телец Леви при БП. Считается, что в клетке α -синуклеин находится в двух формах: в нативной и мембран-связанной. Нативная, физиологически активная, форма представлена тетрамером. При переходе в мембран-связанную форму происходит конформационная трансформация в α -спираль. α -синуклеин способен агрегировать при повышенной концентрации в растворе [14].

Расположение белка в пресинаптических терминалях и его способность связываться с мембранами говорит о его возможном участии в регуляции везикулярного нейронального транспорта. Кроме того, обнаружено, что α -синуклеин может контролировать количество дофамина внутри клеток, напрямую взаимодействуя с белками, ответственными за его синтез и обратный

захват. Таким образом, α -синуклеин способен играть роль регулятора дофаминовой токсичности, контролируя входящий и выходящий из клетки дофамин. Отмечается также, что нейродегенерация при БП вероятнее всего связана именно с повышенной экспрессией α -синуклеина, а не со снижением его функциональной активности [14].

В настоящее время главным звеном патогенеза при БП считается формирование нейротоксических агрегатов α -синуклеина. Нейротоксичность агрегатов α -синуклеина была многократно продемонстрирована *in vitro*, однако механизмы токсичности остаются невыясненными [15].

После идентификации мутаций α -синуклеина в 1997 году двадцать лет генетических исследований привели к идентификации нескольких моногенных форм БП и многочисленных генетических факторов риска, повышающих риск развития БП. Гены, участвующие в семейных моногенных формах БП, ранее получали номер *PARK* (*PARK1*, *PARK2* и т.д.) в порядке обнаружения. В настоящее время около 20 генетических локусов связаны с развитием БП, включая ауtosомно-доминантный α -синуклеин, киназу 2 с богатыми лейцином повторами (*LRRK2*) и ауtosомно-рецессивный паркин, РТЕН-индуцированная предполагаемая киназа 1 (*PINK1*) и *DJ-1* [16]. Около 3-5% семейных случаев БП демонстрируют явную менделевскую наследственность и имеют известную моногенную причину, при этом *LRRK2* составляет подавляющее большинство случаев [16]. Основные выводы из этих недавних генетических открытий подтвердили важность митохондрий в нейродегенеративном процессе БП, поскольку множество генов, однозначно связанных с заболеванием, кодируют белки, которые имеют отношение к митохондриальному гомеостазу. Среди этого подмножества – убиквитинлигаза E3, *PINK1*, белок дегликаз *DJ-1*, *LRRK2*, АТФаза 13A2 (*ATP13A2*) и белок, связанный с сортировкой вакуолярных белков 35 (*VPS35*). При спорадической БП в большинстве случаев возникают генетические варианты, повышающие риск БП. Среди этих факторов риска наиболее распространены *LRRK2*, *GBA* (кодирующий

лизосомальный фермент глюкоцереброзидазу), *SNCA* и *MAPT* (кодирующий тау-белок) [17].

1.2 Гены, вовлеченные в патогенез БП

Как уже говорилось выше, к вероятным эндогенным причинам развития БП относятся мутации около 20 генетических локусов. Особенно широко обсуждается роль в патогенезе БП митохондриальной дисфункции и ассоциированных с ней мутаций в генах *PARK2*, *PINK1*, *DJ1* (*PARK7*), *LRRK2*. Мутации в тех или иных генах чаще обнаруживаются при раннем развитии заболевания и в семейных случаях.

Таблица 1 – Распространенность мутаций в причинных генах менделирующих форм БП среди пациентов

Ген	Тип мутаций	Частота, %
<i>SNCA</i>	мультипликации, крайне редко ОНЗ	1,4
<i>PARK2</i>	ОНЗ и крупные делеции/дупликации	35 - 83
<i>PINK1</i>	ОНЗ и небольшие инсерции/делеции	8
<i>DJ1</i> (<i>PARK7</i>)	делеции экзонов	1-2
<i>ATP13A2</i>	крупные делеции/дупликации	1,7 - 3,6
<i>LRRK2</i>	ОНЗ	1-4

Так как набор реагентов SALSA MLPA P051 Parkinson mix 1 позволяет анализировать лишь некоторые крупные делеции и мультипликации, а также точечные мутации в генах *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1*, *ATP13A2* и *LRRK2* (Таблица 1), то далее будут рассмотрены литературные данные именно об упомянутых генах и их роли в развитии БП.

1.2.1 Ген *SNCA*

Среди пациентов с наследственной аутосомно-доминантной формой БП нередко встречаются мультипликации гена *SNCA*, кодирующего белок α -синуклеин [18]. Тяжесть заболевания коррелирует с числом копий гена: у пациентов с дупликацией гена *SNCA* начало заболевания приходилось на возраст старше 40 лет и не отличалось от идиопатической БП. При наличии трипликации гена *SNCA* наблюдается раннее начало БП (до 40 лет). Частота больных семейной формой БП, обусловленной мультипликациями гена *SNCA*, в различных популяциях в среднем составляет 1,4%. При спорадической форме БП частота больных с дупликациями и трипликациями гена *SNCA* в среднем составляет 0,3% [19]. Также описаны крайне редко встречающиеся (<1%) у людей с БП точечные мутации гена (A53T, A30P, E46K). Для российских пациентов с БП была показана частота встречаемости дупликаций *SNCA* 0,6% [20].

1.2.2 Ген *PARK2*

Мутации в гене *PARK2*, кодирующем белок паркин – цитозольную убиквитин-Е3-лигазу, являются одной из самых частых причин развития аутосомно-рецессивной формы БП с ранним началом (до 50% случаев), а также часто встречаются при спорадических случаях заболевания с ранним началом. Паркин представляет собой большой ген с более чем 200 известными мутациями, рассеянными по всем 12 экзонам. Примерно половина из них – это небольшие (точечные) мутации, остальные же 50% – это геномные перестройки (крупные делеции и/или дупликации). При исследовании российских пациентов с БП частота встречаемости мутаций в гене паркина составила 35% [21], для китайских пациентов – 75% [22], а для пациентов из Нидерландов – 83% [23].

Основная роль паркина состоит в регуляции митофагии. Белок локализован в комплексе Гольджи и цитозоле нейронов подкорковых ядер головного мозга. Наибольшая концентрация паркина обнаружена в пигментных клетках компактной зоны ЧС.

1.2.3 Ген *PINK1*

Аутосомно-рецессивные семейные формы БП, обусловленные мутациями в гене PTEN-индуцированной киназы 1 типа (*PINK1*), характеризуются ранним началом заболевания. Большинство мутаций в гене *PINK1* составляют ОНЗ (однонуклеотидные замены) или небольшие инсерции/делеции. В целом, частота встречаемости мутаций в этом гене составляет до 8% у пациентов с БП разных популяций [24].

PINK1 – это протеинкиназа, которая обладает нейропротекторным эффектом благодаря фосфорилированию специфических митохондриальных белков. При падении потенциала на мембране митохондрии белок *PINK1* фосфорилируется по Ser-402 и становится активным. Активированная киназа *PINK1* рекрутирует белок паркин к внешней мембране поврежденной митохондрии. Паркин убиквитинилирует свои субстраты на поверхности митохондрии, что служит сигналом для направления такой митохондрии на митофагию. Таким образом, паркин и *PINK1* вовлечены в один каскад реакций, регулирующих функции митохондрий и обеспечивающих их правильную утилизацию. Дефект одного из участников каскада ведет к накоплению поврежденных митохондрий, увеличению продукции активных форм кислорода и, следовательно, к гибели нейронов [25].

1.2.4 Ген *DJ1 (PARK7)*

В редких случаях причиной БП с аутосомно-рецессивным типом наследования, ранним началом и медленным прогрессированием выступают мутации в гене *DJ-1* (локус *PARK7*). Например, делеция 1–5 экзонов гена, полностью блокирующая синтез белка, и миссенс замена L166P, приводящая к быстрой деградации фермента. В целом, мутации в *PARK7* встречаются не более чем в 1-2% случаях ранней формы болезни Паркинсона [26]. Согласно исследованию [27], среди российских пациентов также были выявлены случаи делеции 3 экзона гена *PARK7*.

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. 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 [28].

1.2.5 Ген *ATP13A2*

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. Идентификация компаундных гетерозиготных делеций и мутаций сайта сплайсинга у пораженных членов большой чилийской семьи привели к установлению гена-кандидата – АТФазы типа 13A2 (*ATP13A2*). Этот ген содержит 29 экзонов. В иорданской семье была идентифицирована гомозиготная дупликация 22 п.о. (пар оснований). Другие вариации гена, ассоциированные с ранними проявлениями паркинсонизма обнаружены в Бразилии и Италии. Нокдаун ортолога гена *ATP13A2* в *Caenorhabditis elegans* неизвестным путем повышает уровень некорректного фолдинга α -синуклеина, а ортолог гена *ATP13A2* 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 [29].

1.2.6 Ген *LRRK2*

Ген *LRRK2* находится в локусе *PARK8*, который был картирован в японской семье в 2002 году, на хромосоме 12q12 (длинное плечо) [30]. В 2004 году мутации в гене дардарина впервые были обнаружены в британской семье у больных с аутосомно-доминантным типом БП, а также в семьях басков в Испании. Ген состоит из 51 экзона и кодирует большой белок (2527 аминокислотных остатков, 286 кДа), содержащий ряд функциональных

доменов. В настоящее время доказано, что мутации в гене *LRRK2*, кодирующем обогащенную лейциновыми повторами киназу 2 (дардарин), приводят к развитию аутосомно-доминантной формы БП с поздним началом, а также ответственны за некоторые спорадические случаи. При этом, точечные мутации в гене данной киназы являются наиболее частой причиной семейной БП. На данный момент описано более 50 мутаций в гене *LRRK2*, большинство из них относится к миссенс-мутациям [31]. Мутация p.G2019S является наиболее распространенной, ее доля от всех мутаций в *LRRK2* составляет около 75% [1]. По данным международного консорциума по *LRRK2* мировая частота встречаемости данной мутации составила 1% среди пациентов со спорадической БП и 4% среди семейных случаев (средние значения по 24 популяциям мира) [32]; 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%. Стоит отметить, что мутация p.G2019S не обнаружена в некоторых азиатских популяциях [33, 34]. Среди российских пациентов с БП частота встречаемости p.G2019S составила 0,7% для спорадической формы и 7,7% для семейной формы БП [35]. Помимо мутации p.G2019S к аутосомно-доминантной форме БП приводят еще несколько менее распространенных ОНЗ в гене дардарина: p.I2020T, p.R1441C/G/H, p.Y1699C и p.N1437H.

Пенетрантность *LRRK2*-БП является неполной и зависит от возраста и этнической принадлежности, что может объяснить, почему точечные мутации *LRRK2* лежат в основе до 1–2% явно идиопатических случаев БП, при этом пенетрантность варьирует (от 24% до почти 100%) в зависимости от конкретной мутации и конкретного исследования. Некоторые точечные мутации в гене дардарина, такие как p.I2020T, встречаются редко и обладают высокой пенетрантностью. И наоборот, ОНЗ p.G2019S является распространенной, но лишь умеренно пенетрантной, что может помочь объяснить, почему точечные мутации *LRRK2* лежат в основе до 1–2% явно

спорадических форм БП. Согласно исследованию международного консорциума по *LRRK2*, риск развития БП для человека с мутацией p.G2019S в среднем составляет 28% в возрасте 59 лет, 51% в возрасте 69 лет и 74% в возрасте 79 лет (пенетрантность мутации определяли у 1045 человек с мутациями *LRRK2* из 133 семей). Пенетрантность (кумулятивный риск БП до возраста 80 лет) *LRRK2* G2019S в AJ составляет всего 26% и ниже, чем в других этнических группах. [32].

LRRK2 представляет собой многодоменную киназу, включающую в себя два ферментативных домена (GTPазный и серин-треонинкиназный), связывающий их COR домен и концевые домены белок-белкового взаимодействия (LRR, ARM, ANK и WD-40) (Рис.1). Тандемная структура домена RocCOR квалифицирует киназу как член суперсемейства белков ROCO и предполагает, что домен COR может опосредовать взаимодействия между GTPase и киназой *LRRK2*, что было подтверждено в различных исследованиях [36, 37]. Было продемонстрировано, что большинство известных ассоциированных с БП мутаций *LRRK2* повышают активность киназного домена. Мутация p.G2019S локализована в сайте, кодирующем петлю активации киназы, и предполагается, что она увеличивает ферментативную активность путем повышения доступа субстрата к петле активации [38]. Мутация p.R1441G является второй по распространенности в Европе, после p.G2019S. Она также повышает активность киназы, подавляя гидролиз GTP и повышают сродство *LRRK2* к GTP, что приводит к 3-4-кратной активации киназы [39]. В испанской популяции частота p.R1441G составила 2,6% среди случаев семейной БП с поздним началом (после 40 лет), а частота p.R1441C – 1,3% среди семейных случаев с поздним началом [40]. В России мутация p.R1441G была выявлена лишь у 1ого пациента из 330, имевшего спорадическую форму БП [41].

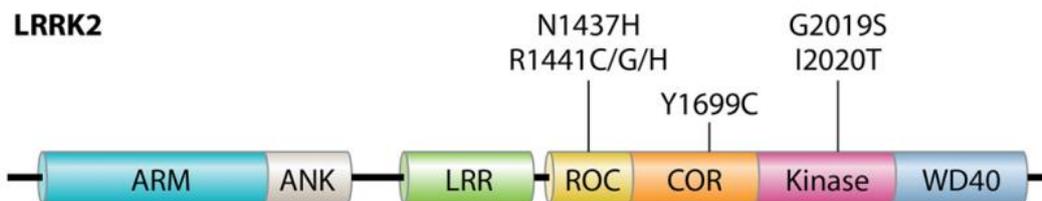


Рисунок 1 – Доменное строение киназы LRRK2 с локализацией наиболее значимых мутаций

Белок дардарин экспрессируется на низких уровнях по всему телу, с самыми высокими уровнями в почках, легких и иммунных клетках и умеренной экспрессией в головном мозге. В головном мозге экспрессия наиболее высока в скорлупе, которая является мишенью нейронов черной субстанции, хотя она также измеряется и в самой черной субстанции [42].

Дардарин играет роль в нормальном функционировании лизосом, регуляции иммунной функции, апоптоза и аутофагии. Кроме того, опосредованно LRRK2 физически или генетически взаимодействует с рядом других генов БП (*GBA*, *MAPT*, *PINK1*, *PARK2*, *SNCA*) [1, 3]. Многократно показано, что экспрессия гена *LRRK2* со всеми патогенными мутациями, изменяющими строение или активность киназного домена, вызывает нейротоксический эффект. Однако патогенетический механизм мутаций в гене *LRRK2* в настоящее время не выяснен окончательно.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Предмет исследования

В исследование были включены 76 пациентов с подтвержденным диагнозом БП: 22 (28,9%) мужчины и 54 (71,1%) женщины в возрасте от 20 до 85 лет на момент обследования – поступивших на консультативный прием в ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Красноярск). Молекулярно-генетическая часть работы выполнялась на базе «Научно-практической лаборатории молекулярно-генетических методов исследований» Сибирского федерального университета (г. Красноярск).

В исследование включались пациенты, имевшие все критерии включения и не имевшие ни одного критерия исключения.

Критерии включения: 1) возраст старше 18 лет; 2) пациент способен прочитать информационный листок пациента и добровольно подписать информированное согласие; 3) у пациента установлен диагноз болезни Паркинсона в соответствии с «United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria»; 4) возраст на момент дебюта заболевания (появления моторных симптомов) до 50 лет и/или указание на наличие у кровных родственников болезни Паркинсона.

Критерии исключения: 1) отказ пациента; 2) данные о наличии у пациента другого нейродегенеративного заболевания, нежели болезнь Паркинсона; 3) отсутствие технической возможности для проведения венепункции (поражение поверхностных вен, воспаление кожных покровов).

Проведение исследования одобрено Локальным этическим комитетом при ФГБУ «Федеральный Сибирский научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства» (г. Красноярск).

Предметом исследования являлись образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов цельной крови пациентов.

2.2 Выделение ДНК с помощью набора реагентов Wizard Genomic DNA Purification Kit («Promega»)

В соответствии с рекомендациями компании MRC-Holland, для надежности результатов MLPA-анализа выделение ДНК проводили с использованием набора реагентов Wizard Genomic DNA Purification Kit («Promega») согласно инструкции производителя набора.

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

1. Подготовить чистые пробирки, подписать и разлить в них по 900 мкл Cell Lysis Solution.

2. Быстро разморозить (можно прогреть в руке) пробирки с замороженной кровью, аккуратно перемешать содержимое переворачиванием, отобрать аликвоты 300 мкл в соответствующие приготовленные пробирки (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) на 1-2 часа.

4. Открутить пробирки 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 раз поставить на платформу для перемешивания на 30 минут – 1 час.

7. Повторить п. 4, слить супернатант. Встряхнуть пробирки до тех пор, пока осадок лейкоцитов не растворится (10–15 секунд).

8. Добавить 300 мкл Nuclei Lysis Solution в пробирки, содержащие ресуспендированные клетки. Перемешать на вортексе, чтобы лизировать лейкоциты. Раствор должен стать очень вязким. Если после смешивания видны

скопления клеток, инкубировать раствор при 37°C до тех пор, пока не будут разрушены все комки. Если скопления все еще видны через 1 час, добавить дополнительно 100 мкл Nuclei Lysis Solution и повторить инкубацию.

9. Добавить 100 мкл Protein Precipitation Solution и перемешать 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, добавить в общей сложности 130 мкл раствора для осаждения протеина для объема проб 300 мкл.

10. Центрифугировать пробирки при 13–16 тыс. оборотов в течение 3 минут при комнатной температуре. Должен быть виден темно-коричневый белковый осадок.

11. В чистые 1,5 мл пробирки налить 300 мкл изопропанола комнатной температуры. Перенести супернатант в эти пробирки.

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

13. Центрифугировать пробирки при 13–16 тыс. оборотов в течение 1 минуты при комнатной температуре. ДНК будет видна в виде белого осадка.

14. Слить супернатант и добавить 300 мкл 70% этанола. Осторожно перевернуть пробирки несколько раз, чтобы растворить осадок ДНК. Повторить центрифугирование как в п. 13.

15. Удалить этанол отсасывателем очень осторожно, так как в этот момент гранулы ДНК очень рыхлые и легко могут попасть в наконечник. Перевернуть пробирки на чистую адсорбирующую бумагу и высушить на воздухе в течение 10-15 минут.

16. Добавить 100 мкл DNA Rehydration Solution в пробирки и гидратировать ДНК, инкубируя при 65°C в течение 1 часа. Периодически смешивать раствор, осторожно постукивая по пробирке.

17. Хранить ДНК при 2-8°C.

2.3 Измерение концентрации выделенной ДНК

Для MLPA-анализа существуют рамки допустимого количества ДНК, добавляемого в анализируемую пробу: от 50 до 250 нг. В связи с этим после выделения ДНК нужно измерить ее концентрацию и при необходимости развести или выпарить до приемлемых значений, однако увеличение концентрации ДНК в растворе путем выпаривания может негативно сказаться на результатах анализа MLPA, т.к. он чувствителен к содержанию некоторых побочных агентов в растворе ДНК, например, таких как ЭДТА, поэтому в случае получения слишком низкой концентрации ДНК лучше выделить ее заново.

Измерение концентрации ДНК проводилось с использованием набора реагентов Quant-iT™ hsDNA Assay Kit и флуориметра Qubit (Invitrogen) согласно следующей методике:

1. Разморозить все реагенты при комнатной температуре.
2. Расставить пробирки на 0,5 мл в количестве (n), равном числу образцов ДНК плюс 2 стандарта (стандартные растворы для калибровки прибора). Подписать на крышечках номера образцов и стандартов.
3. Приготовить рабочую смесь: $1 \times n$ мкл красителя + $197 \times n$ мкл буфера.
4. Раскапать в пробирки:
 - а) для каждого из 2 стандартов: 1 мкл красителя + 189 мкл буфера + 10 мкл стандарта;
 - б) для исследуемых образцов: 198 мкл рабочей смеси + 2 мкл ДНК.
5. Вortexировать 2 –3 сек, сбросить капли.
6. Инкубировать 2 мин при комнатной температуре.
7. Произвести калибровку флуориметра с помощью стандартов.
8. Произвести измерение концентрации ДНК в образцах.

2.4 Проведение MLPA-анализа

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 состоит в том, что одновременно в одной пробирке можно 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.

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.

Набор реагентов SALSA MLPA P051 Parkinson mix 1 содержит в себе 38 зондов для анализа копийности различных экзонов генов *PARK7*, *ATP13A2*, *PINK1*, *SNCA* и *PARK2*, а также 2 зонда для анализа точечных мутаций p.A30P в гене *SNCA* и p.G2019S в гене *LRRK2*.

MLPA-анализ проводится в течение 2 дней и включает в себя 6 основных этапов: денатурация, гибридизация, лигазная реакция, ПЦР-амплификация гибридизованных ДНК-зондов, электрофоретическая детекция продуктов ПЦР путем фрагментного анализа и количественный анализ полученных данных с помощью программного обеспечения Coffalyzer.Net. Кратко рассмотрим эти этапы:

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. Реакция гибридизации является самым длительным этапом и занимает 16–20 часов.

2. Лигирование.

По завершении реакции гибридизации в пробирки добавляют фермент — лигазу, которая «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.

3. ПЦР.

Затем в реакцию вносят ПЦР-смесь, содержащую пару универсальных праймеров, меченных флуоресцентным красителем. Происходит экспоненциальное накопление меченых ПЦР-продуктов, которые являются копиями имеющихся в реакции лигированных зондов, т.е. в ПЦР участвует не выделенная (исследуемая) ДНК, а гибридизовавшиеся на ней зонды. Количество ПЦР-продуктов зависит от числа гибридизовавшихся на анализируемой ДНК зондов, а значит и числа исследуемых генов в данном образце. ПЦР 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, дать флуоресцентный сигнал.

4. Фрагментный анализ.

По завершении ПЦР проводится детекция продуктов амплификации при помощи капиллярного электрофореза. Каждый амплифицируемый во время ПЦР зонд имеет свою 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 полученных данных.

На заключительном этапе происходит количественный анализ флуоресценции проб. Интенсивность флюоресценции исследуемых генов сравнивается с интенсивностью флюоресценции «референсных» генов (гены, которые при БП не подвергаются количественным нарушениям). Вычисляя отношение интенсивностей флуоресценции — исследуемый ген/референсный ген — делается вывод о наличии/отсутствии численных нарушений (дупликации/делеции) анализируемых генов в исследуемом образце. Данный этап проводится с помощью программного обеспечения, разработанного именно для анализа результатов MLPA.

2.5 Секвенирование по Сенгеру

Для достоверного подтверждения наличия точечной мутации p.G2019S в гене *LRRK2*, выявленной методом MLPA у одного из пациентов, было проведено секвенирование соответствующего участка гена *LRRK2*.

2.5.1 Проведение первой ПЦР

Для амплификации интересующего участка гена использовались праймеры, опубликованные ранее М. Chen и соавт. [43]. Реакцию ПЦР проводили с использованием набора Taq Man Fast Advanced Master Mix («Applied Biosystems») на приборе CFX-96 (Bio-Rad) по следующей программе: 3 мин - 95°C; 35 циклов: 30 сек - 95°C, 30 сек - 62°C, 30 сек - 72°C; 10 мин - 72°C.

2.5.2 Детекция продуктов первой ПЦР

Детекция продуктов ПЦР осуществлялась методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле с последующей визуализацией в

ультрафиолетовом свете с использованием системы гель-документирования Gel Doc (Bio-Rad). Гель готовился по следующей методике:

1. Выровнять емкость для геля.
2. Набрать 30 мл дистиллированной воды.
3. Убрать пипеткой 0,6 мл воды.
4. Добавить 0,6 мл 50xTAE буфера, перемешать.
5. Взвесить и высыпать в колбу 0,6 г агарозы.
6. Вылить в колбу смесь дистиллированной воды и буфера.
7. Вскипятить, остудить до 60 градусов.
8. Осторожно добавить 3 мкл бромистого этидиума, перемешать.
9. Вылить гель в емкость, установить пластинки для лунок. Оставить застывать на 30 мин.
10. Убрать гель в холодильник на 10 минут для охлаждения.

2.5.3 Чистка продуктов ПЦР реагентом ExoSAP-IT

Реагент ExoSAP-IT предназначен для простой и быстрой очистки продукта ПЦР для последующих применений, таких как секвенирование ДНК или анализа нуклеотидных полиморфизмов. Когда ПЦР-амплификация завершена, ExoSAP-IT удаляет любые неиспользованные dNTP и праймеры, оставшиеся в смеси продуктов ПЦР.

ExoSAP-IT добавляют непосредственно к продукту ПЦР (в соотношении 2 мкл реагента на 5 мкл раствора ампликонов) и инкубируют при 37°C в течение 15 минут. После обработки ПЦР-продуктов, ExoSAP-IT инактивируется просто путем нагревания до 80°C в течение 15 минут. ExoSAP-IT содержит два гидролитических фермента: экзонуклеазу I и щелочную фосфатазу (SAP) вместе с буфером для удаления dNTP и праймеров из продукта ПЦР. Экзонуклеаза I удаляет одноцепочечные праймеры, содержащиеся в ПЦР-продукте. SAP удаляет несвязавшиеся dNTP из смеси ПЦР.

2.5.4 Проведение секвенирующей ПЦР

Секвенирующую ПЦР проводили с использованием набора реагентов Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

Таблица 2 – Подготовка реакционной смеси для секвенирующей ПЦР (из расчета на 1 пробу)

Компоненты реакционной смеси	Объем, мкл
Дистиллированная вода	3
Буфер	1
Big Dye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	2
Праймер	2
ПЦР-продукт	2

Секвенирующая реакция проводилась на приборе Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) по следующей программе: 1 мин – 96°C; 25 циклов: 10 сек – 96°C, 5 сек – 50°C, 4 мин – 60°C.

2.5.5 Очистка продуктов секвенирующей ПЦР изопропиловым спиртом и запуск капиллярного электрофореза

Очистка продуктов секвенирующей ПЦР проводилась 75% изопропиловым спиртом по следующей методике:

1. В пробирки раскапать по 5 мкл ампликонов и добавить по 80 мкл спирта, плавно пипетируя.
2. Поместить пробирки на платформу для перемешивания на 20 мин.
3. Центрифугировать пробирки 30 мин при 10°C на 3500 оборотах в минуту.
4. Аккуратно убрать спирт с помощью дозатора.
5. Добавить 50 мкл спирта. Центрифугировать пробирки 10 мин при 10°C на 3500 оборотах в минуту.
6. Аккуратно убрать весь спирт.
7. Сушить открытые пробирки в Veriti без штатива при 63°C 3 мин.
8. Добавить по 10 мкл формамида, пипетируя, затем греть в Veriti в штативе по программе: 95°C – 5 мин, 4°C – 10 мин.

9. Перенести в плашку, сбросить капли в центрифуге, загрузить в секвенатор.

Капиллярный электрофорез проводился на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500.

2.6 Аллель-специфичная ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени

Для проведения метода аллель-специфичной ПЦР используют специально синтезированные праймеры, на 3'-конце которых располагается переменный нуклеотид. С образцом выделенной ДНК параллельно проводятся две реакции амплификации – с двумя парами аллель-специфичных праймеров. Образовавшиеся продукты реакции, соответствующие мутантному аллелю и аллелю дикого типа, далее визуализируются с помощью различных методов.

Для анализа мутаций p.R1441G, p.R1441C и p.G2019S в гене *LRRK2* для всех 76 пациентов была проведена аллель-специфичная ПЦР с использованием комплекта реагентов для амплификации «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии EVA Green» (Синтол) и детекцией результатов в режиме реального времени. Для работы были использованы и оптимизированы аллель-специфичные праймеры, подобранные с помощью программ Vector NTI, Primer 3 и DNA folding form (Таблица 3).

Таблица 3 – Праймеры для анализа мутаций в гене *LRRK2*

Праймер	Последовательность
LRRK2 G2019S Forward 1	5'-ATTGCAAAGATTGCTGACTACG-3'
LRRK2 G2019S Forward 2	5'-CATTGCAAAGATTGCTGACTACA-3'
LRRK2 G2019S Reverse	5'-TTGATTTGCCTCACAAGTGC-3'
LRRK2 R1441G/C Forward 1	5'-GTGTCTTTCCCTCCAGGCTC-3'
LRRK2 R1441G Forward 2	5'-GTGTCTTTCCCTCCAGGCTG-3'
LRRK2 R1441C Forward 3	5'-GTGTCTTTCCCTCCAGGCTT-3'
LRRK2 R1441G/C Reverse	5'-GGAACCCTCGCTTATTCAGGA-3'

Аллель-специфическая ПЦР проводилась по следующей методике:

1. Разморозить реактивы при температуре +4°C. После размораживания реактивы встряхнуть и центрифугировать.

2. При приготовлении реакционной смеси рекомендуются следующие объемы компонентов в расчете на одну пробирку:

Наименование	Объем, мкл
dNTP, 2,5 mM	2,5
10xПЦР буфер	2,5
MgCl ₂ , 25mM	1,5
Смесь праймеров, 10пкмоль/мкл каждого	1,2
SynTaq ДНК-полимераза, 5Е/мкл	0,25
dd H ₂ O	до 25,0
Образец ДНК	3 мкл

3. После приготовления реакционной смеси перенести пробирки в систему для проведения ПЦР-РВ в точном соответствии заданным ранее протоколом расположения образцов.

4. Реакцию ПЦР провести на приборе CFX-96 (Bio-Rad) по следующим программам:

- для мутации p.G2019S: 3 мин – 95°C; 40 циклов: 10 сек – 95°C, 10 сек – 64°C, 30 сек – 72°C;

- для мутаций p.R1441G и p.R1441C: 3 мин – 95°C; 40 циклов: 10 сек – 95°C, 10 сек – 67°C, 30 сек – 72°C.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный MLPA-анализ с использованием набора SALSA MLPA P051 не выявил изменения копийности экзонов в генах *PARK2*, *PINK1*, *ATP13A2*, *PARK7*, а также точечную мутацию p.A30P в гене *SNCA* ни у одного из 76 пациентов, и лишь у 1 пациента была выявлена точечная мутация p.G2019S в гетерозиготном состоянии в гене *LRRK2*.

Так как среди кровных родственников пациента с выявленной мутацией p.G2019S в гене *LRRK2* имелось множество случаев БП (указывающих на менделирующую доминантную форму наследования заболевания), были генетически обследованы и осмотрены врачом-неврологом также родственники, для которых это представилось возможным, а именно три дочери пациента. Также методом MLPA-анализа у одной из трёх дочерей пациента была выявлена та же мутация, что и у пациента-пробанда (Рис. 2).

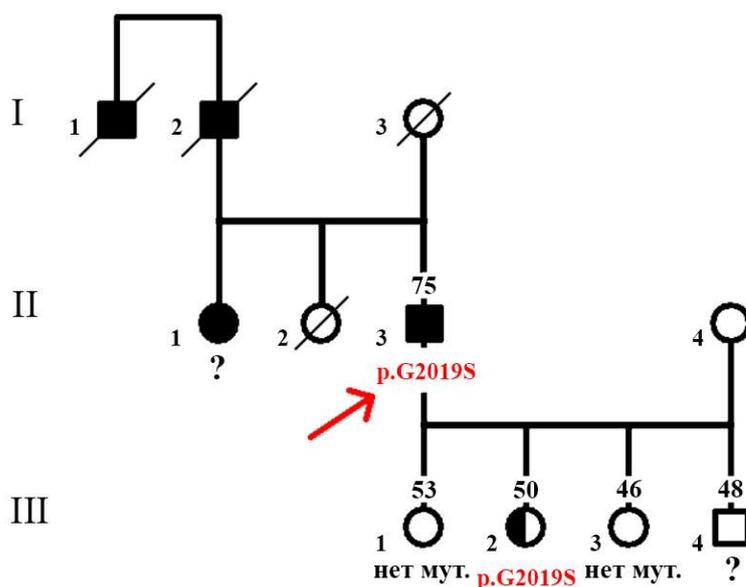


Рисунок 2 – Генеалогическое древо пациента с болезнью Паркинсона, ассоциированной с мутацией p.G2019S. Обозначения: квадраты – мужчины, круги – женщины; зачеркнутые – умершие, полностью закрашенные – имеют (имели) БП, закрашенные наполовину – носители фактора риска БП (мутации), стрелка – пробанд; нет

Изъято в связи с авторскими правами с 31 по 33 стр.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При исследовании БП-ассоциированных мутаций в генах *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1*, *ATP13A2* и *LRRK2* методом МЛРА-анализа лишь у 1 из 76 пациентов (имеющего семейную форму БП с доминантным типом наследования) была выявлена мутация, а именно р.G2019S в гене *LRRK2*. Также данная мутация была выявлена у 1 из 3 дочерей пациента.

2. Был проведен анализ мутаций р.G2019S и р.R1441G/C в гене *LRRK2* методом аллель-специфичной ПЦР-РВ среди 76 пациентов с диагнозом БП; данные мутации выявлены не были, кроме мутации р.G2019 у ранее упомянутого пациента.

3. Методом секвенирования по Сенгеру были подтверждены выявленные случаи мутации р.G2019S в гене *LRRK2*.

4. Таким образом, среди 76 обследованных пациентов был выявлен 1 пациент с мутацией в гене *LRRK2*. Клиническое описание представленного случая *LRRK2*-БП согласуется с литературными данными о фенотипических характеристиках данной формы БП. Выявленная частота встречаемости мутаций в гене *LRRK2* среди пациентов с БП в данном исследовании (1,3%) соответствует таковой среди пациентов с БП в европейских популяциях (1 – 4%). Для пациентов с БП Красноярского края распространенность мутаций в генах *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1* и *ATP13A2*, вероятно, крайне низка, и в представленном исследовании равна нулю.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

dNTP – дидоксинуклеотидтрифосфат

LRRK2-БП – болезнь Паркинсона, ассоциированная с мутациями в гене *LRRK2*

MLPA – мультиплексная лигазная реакция с амплификацией

БП – болезнь Паркинсона

иБП – идиопатическая форма болезни Паркинсона

п.о. – пары оснований

ОНЗ – однонуклеотидная замена

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ЧС – черная субстанция головного мозга

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. 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.
2. Левин, О. С. Болезнь Паркинсона / О. С. Левин, Н. В. Федорова. – Москва: МЕДпресс-информ, 2012. – 351 с.
3. Gasser, T. Update on the genetics of Parkinson's disease / T. Gasser // Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society. – 2007. – Vol. 22. – №. 17. – P. 343-350
4. Goedert, M. 100 years of Lewy pathology / M. Goedert [et al] // Nature Reviews Neurology. – 2013. – Т. 9. – С. 13–24.
5. Duyckaerts, C. Neuropathology of iatrogenic Creutzfeldt Jakob disease and immunoassay of French cadaversourced growth hormone batches suggest possible transmission of tauopathy and long incubation periods for the transmission of Abeta pathology / C. Duyckaerts [et al] // Acta Neuropathologica. – 2018. – Т. 135. – С. 201–212.
6. Agid, Y. Parkinson's disease: pathophysiology / Y. Agid // Lancet. – 1991. – Т. 337. – С. 1321–1324.
7. Duvoisin, R. C. Twin study of Parkinson disease / R. C. Duvoisin [et al] // Neurology. – 1981. – Т. 31. – С. 77–80.
8. Marttila, R. J. Parkinson's disease in a nationwide twin cohort / R. J. Marttila [et al] // Neurology. – 1988. – Т. 38. – С. 1217–1219.
9. Tanner, C. M. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease / C. M. Tanner [et al] // Environmental Health Perspectives. – 2011. – Т. 119. – С. 866–872.
10. Costello, S. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California / S. Costello [et al] // American Journal of Epidemiology. – 2009. – Т. 169. – С. 919–926.

11. Hoöglinger, G. U. The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy / G. U. Hoöglinger [et al] // *Journal of Neurochemistry*. – 2005. – Т. 95. – С. 930–939.
12. Schapira, A. H. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease / A. H. Schapira [et al] // *Lancet*. – 1989. – Т. 1. – С. 126-129
13. Dexter, D. T. Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease / D. T. Dexter [et al] // *Annals of Neurology*. – 1994. – Т. 35. – С. 38–44.
14. Андоскин, П. А. Альфа-синуклеин крови как белковый маркер болезни Паркинсона : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.04 / Андоскин Павел Александрович. – Санкт-Петербург, 2015. – 126 с.
15. Болезнь Паркинсона и расстройства движений : руководство для врачей / под ред. С. Н. Иллариошкина. – Москва, 2014. – 391 с.
16. Blauwendraat, C. The genetic architecture of Parkinson's disease / C. Blauwendraat, M. A. Nalls, A. B. Singleton // *Lancet Neurology*. – 2020. – Т. 19. – С. 170–178.
17. Chang, D. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci / D. Chang [et al] // *Nature Genetics*. – 2017. – Т. 49. – С. 1511–1516.
18. Singleton, A. B. α -Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease / A. B. Singleton, M. Farrer, J. Johnson [et al] // *Science*. – 2003. – Vol. 302. – №. 5646. – P. 841-841.
19. Lesage, S. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors / S. Lesage, A. Brice // *Human molecular genetics*. – 2009. – Vol. 18. – №. 1. – P. 48-59.
20. Иллариошкин, С. Н. Гетерогенность спорадической болезни Паркинсона: молекулярный подход к решению проблемы / С. Н. Иллариошкин, П. А. Сломинский, М. И. Шадрин // *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. – 2007. – Т. 1. – №. 1. – С. 23-31.

21. Illarioshkin, S. N. Mutation analysis of the parkin gene in Russian families with autosomal recessive juvenile parkinsonism / S. N. Illarioshkin, M. Periquet, N. Rawal [et al] // *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*. – 2003. – Vol. 18. – №. 8. – P. 914-919.

22. Guo, J. F. Exon dosage analysis of parkin gene in Chinese sporadic Parkinson's disease / J. F. Guo, X. L. Dong, Q. Xu [et al] // *Neuroscience Letters*. – 2015. – Vol. 604. – P. 47-51.

23. Elfferich, P. Breakpoint mapping of 13 large parkin deletions/duplications reveals an exon 4 deletion and an exon 7 duplication as founder mutations / P. Elfferich, M. C. Verleun-Mooijman, J. A. Maat-Kievit [et al] // *Neurogenetics*. – 2011. – Vol. 12. – №. 4. – P. 263-271.

24. Tan, E. K. PINK1 mutations in sporadic early-onset Parkinson's disease / E. K. Tan, K. Yew, E. Chua [et al] // *Movement disorders*. – 2006. – Vol. 21. – №. 6. – P. 789-793.

25. 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.

26. Hedrich, K. DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease / K. Hedrich, A. Djarmati, N. Schäfer [et al] // *Neurology*. – 2004. – Vol. 62. – №. 3. – P. 389-394.

27. Филатова, Е. В. Анализ мутаций у пациентов с предполагаемой аутосомно-доминантной формой болезни Паркинсона / Е. В. Филатова, А. Х. Алиева, М. И. Шадрина [и др.] // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2014. – №. 1. – С. 3-4.

28. Bonifati, V. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism / V. Bonifati, P. Rizzu, M. J. Van Baren [et al] // *Science*. – 2003. – Vol. 299. – №. 5604. – P. 256-259.

29. Schneider, S. A. ATP13A2 mutations (PARK9) cause neurodegeneration with brain iron accumulation / S. A. Schneider, C. Paisan-Ruiz, N. P. Quinn [et al] // *Movement Disorders*. – 2010. – Vol. 25. – №. 8. – P. 979-984.
30. Funayama, M. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-p13.1 / M. Funayama, K. Hasegawa, H. Kowa [et al] // *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. – 2002. – Vol. 51. – №. 3. – P. 296-301.
31. Shulman, J. M. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis / J. M. Shulman, P. L. De Jager, M. B. Feany // *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. – 2011. – Vol. 6. – P. 193-222.
32. Healy, D. G. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study / D. G. Healy, M. Falchi, S. S. O'Sullivan [et al] // *The Lancet Neurology*. – 2008. – Vol. 7. – №. 7. – P. 583-590.
33. Shu, L. A comprehensive analysis of population differences in LRRK2 variant distribution in Parkinson's disease / L. Shu, Y. Zhang, Q. Sun [et al] // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2019. – Vol. 11. – P. 13.
34. Tan, E. K. The G2019S LRRK2 mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients / E. K. Tan, H. Shen, L. C. Tan [et al] // *Neuroscience letters*. – 2005. – Vol. 384. – №. 3. – P. 327-329.
35. Illarioshkin, S. N. A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia / S. N. Illarioshkin, M. I. Shadrina, P. A. Slominsky [et al] // *European journal of neurology*. – 2007. – Vol. 14. – №. 4. – P. 413-417.
36. Civiero, L. Biochemical characterization of highly purified leucine-rich repeat kinases 1 and 2 demonstrates formation of homodimers / L. Civiero, R. Vancraenenbroeck, E. Belluzzi [et al] // *PLoS One*. – 2012. – Vol.7. – №8. – P. e43472.

37. Deniston, C. K. Structure of LRRK2 in Parkinson's disease and model for microtubule interaction / C. K. Deniston, J. Salogiannis, S. Mathea [et al] // *Nature*. – 2020. – Vol. 588. – P. 344–349.
38. Usmani, A. The Cell Biology of LRRK2 in Parkinson's disease / A. Usmani, F. Shavarebi, A. Hiniker // *Molecular and Cellular Biology*. – 2021. – Vol. 41. – №. 5. – P. e00660-20.
39. Steger, M. Phosphoproteomics reveals that Parkinson's disease kinase LRRK2 regulates a subset of Rab GTPases / M. Steger, F. Tonelli, G. Ito [et al] // *Elife*. – 2016. – Vol. 5 – P. e12813.
40. Greggio, E. Role of LRRK2 kinase activity in the pathogenesis of Parkinson's disease / E. Greggio // *Biochemical Society Transactions*. – 2012. – Vol. 40. – № 5. – P. 1058–1062.
41. Пчелина, С. Н. Клиническое течение LRRK2-ассоциированной болезни Паркинсона / С. Н. Пчелина, О. Н. Иванова, А. К. Емельянов [и др.] // *Журнал неврологии и психиатрии им. СС Корсакова*. – 2011. – Т. 111. – №. 12. – С. 56-62.
42. West, A. B. Parkinson's disease-associated mutations in LRRK2 link enhanced GTP-binding and kinase activities to neuronal toxicity / A. B. West, D. J. Moore, C. Choi [et al] // *Human Molecular Genetics*. – 2007. – Vol. 16. – P. 223–232.
43. Chen, M. Generation of an induced pluripotent stem cell line (DANi-011A) from a Parkinson's disease patient with a LRRK2 p. G2019S mutation / M. Chen, M. Maimaitili, S. H. Buchholdt [et al] // *Stem Cell Research*. – 2020. – Vol. 45. – P. 101781.

Министерство науки и высшего образования РФ
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«**СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой

 Ч.Е. Димских

подпись инициалы, фамилия

«23» июль 2023г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Анализ мутаций в генах, ассоциированных с развитием болезни Паркинсона, у
пациентов Красноярского края

тема

06.04.01 – Биология

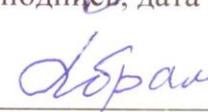
06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Руководители


подпись, дата

доцент, канд. биол. наук
должность, ученая степень

Т.Н. Субботина


подпись, дата

врач-невролог
должность, ученая степень

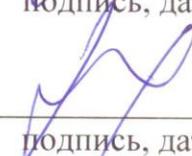
В.Г. Абрамов

Выпускник


подпись, дата

А.А. Шалёва

Рецензент


подпись, дата

профессор, д-р. мед. наук
должность, ученая степень

Д.В. Похабов

Красноярск 2023