

*О.А.Якуц<sup>1</sup>, К.А. Моссэ<sup>1</sup>, С.А. Лухачев<sup>2</sup>, И.В. Плешко<sup>2</sup>  
V.A.Yacuts<sup>1</sup>, K.A.Mosse<sup>1</sup>, S.A. Likhachev<sup>2</sup>, I.V.Pleshko<sup>2</sup>*

## **Изучение молекулярногенетической природы ранней и ювенильной форм болезни паркинсона в Республике Беларусь**

*ГУ РНПЦ «Мать и дитя»<sup>1</sup>*

*ГУ «РНПЦ неврология и нейрохирургия»<sup>2</sup>*

Болезнь Паркинсона – это второе по частоте нейродегенеративное заболевание человека, которое распространено во всех популяциях мира. Заболевание имеет мультифакториальную природу с выраженной генетической составляющей. Для определения точечных мутаций и экзонных перестроек в гене PARK2 был проведен анализ образцов ДНК от пациентов с болезнью Паркинсона с использованием методов секвенирования и dHPLC. Генетический дефект был установлен у 4 из 52 обследованных пациентов. Были обнаружены точечные мутации R275W и N273S, а также делеции 3 и 4 экзонов.

Ключевые слова: Паркин, Болезнь Паркинсона с ранним началом, делеция экзона

Паркинсонизм - это медленно прогрессирующий неврологический синдром, характеризующийся повышением тонуса мышц, гипокинезией, дрожательным [2] [гиперкинезом и постуральными нарушениями

В настоящее время все случаи паркинсонизма подразделяют на:

- первичный (идиопатический) паркинсонизм, к которому относят болезнь Паркинсона и ювенильный паркинсонизм - особую генетически обусловленную форму раннего паркинсонизма;
- вторичный паркинсонизм – синдром, развивающийся в качестве одного из клинических проявлений (осложнений) ряда самостоятельных заболеваний и поражений ЦНС;
- паркинсонизм при мультисистемных нейродегенеративных заболеваниях (так называемый паркинсонизм «плюс»);
- паркинсонизм при наследственных заболеваниях ЦНС.

Более 70% всех случаев паркинсонизма в популяциях приходится на долю первичного паркинсонизма и, в первую очередь, БП. Заболевание встречается повсеместно, его частота варьирует от 150 до 300 на 100000 населения, резко увеличиваясь с возрастом. Среди лиц старше 60 лет данное заболевание встречается с частотой 1–2%, что делает болезнь Паркинсона вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием после болезни Альцгеймера [2, 3].

Наиболее характерными проявлениями болезни Паркинсона являются гипокинезия, мышечная гипертония в виде экстрапирамидной ригидности (пластический тонус), дрожательный гиперкинез и постуральные расстройства. Эти симптомы могут быть выражены в различной степени, в связи с чем клинически выделяют акинетическую, акинетико-ригидную, ригидно-дрожательную и дрожательную формы паркинсонизма.

Болезнь, в основном, манифестирует после 50 лет. В то же время генетически обусловленный паркинсонизм может развиваться и в молодом возрасте. Симптомы развиваются постепенно, вовлекая конечности на одной стороне. Гипокинезия проявляется снижением двигательной активности, что выражается нарушением инициативы к совершению движений, их замедленностью, уменьшением амплитуды. Ригидность характеризуется пластическим повышением мышечного тонуса, нарастающим в процессе исследования. Дрожательный гиперкинез в типичных случаях проявляется тремором покоя в дистальных отделах конечностей. Постуральная неустойчивость возникает вследствие нарушений в системе поддержания центра тяжести тела и проявляется пошатыванием при ходьбе, частыми падениями, пропульсиями. У больных возникает необходимость в использовании опорных приспособлений. Кроме двигательных нарушений, в 40% случаев развиваются депрессия, в 20–40% случаев - когнитивные нарушения и в 20% случаев - психотические нарушения. Характерны для заболевания и вегетативные расстройства. К раннему паркинсонизму относятся случаи первичного паркинсонизма, развившегося в возрасте до 45 лет [3, 4]. В рамках этой возрастной группы выделяется подгруппа лиц с юношеским (ювенильным) паркинсонизмом, у которых заболевание манифестирует до 20-25 лет. Подавляющее большинство юношеского паркинсонизма связано с рецессивными мутациями недавно открытых генов – PARKIN, DJ1 и PINK1, продукты которых контролируют процессинг нейрональных белков и особенности окислительного метаболизма нигральных нейронов [3]. Эти случаи обозначаются как аутосомно-рецессивный ювенильный паркинсонизм (AP-ЮП), который обуславливает значительную часть случаев “молодого” паркинсонизма и характеризуется рядом своеобразных клиничко-морфологических проявлений [3, 4]. Данное заболевание встречается практически во всех изученных популяциях мира. Основное значение в развитии AP-ЮП имеет ген PARK2 (PARKIN), локализованный на хромосоме 6q и кодирующий белок с убиквитин-лигазной функцией [10]. Показано, что этот белок является важнейшим звеном системы клеточной защиты и, в частности, непосредственно участвует в деградации  $\alpha$ -синуклеина – классического белкового маркера БП в составе характерных интранейрональных включений (телец Леви) [3].

Гомозиготные мутации гена PARK2 при первичном паркинсонизме, манифестирующем до 20 лет выявляются более чем в 70% семейных и в 15% sporadических случаев [8]. Значительно реже при аутосомно-рецессивном ювенильном паркинсонизме выявляются гомозиготные мутации в генах PINK1 и DJ1. Весьма редко у гомозиготных носителей мутаций гена PARK2 описывается начало болезни в более позднем возрасте (вплоть до 6-го десятилетия жизни), и такие случаи могут быть неотличимы от “классической” болезни Паркинсона. По данным разных авторов, от 5 до 10% всех случаев болезни Паркинсона имеют моногенную природу с аутосомно-доминантным наследованием [8]. Они обусловлены мутациями в генах  $\alpha$ -синуклеина, UCH-L1, LRRK2 и некоторых других.

Таким образом, раннее выявление первичного паркинсонизма весьма важно для дальнейшего ведения пациентов и предполагает применение своевременной терапии. В этой связи особое значение приобретает идентификация у пациентов с ранней и ювенильной формой БП генных мутаций с использованием ДНК-анализа

#### Материал и методы

Исследуемую группу составили пациенты с клиническим диагнозом болезнь Паркинсона, которые находились на стационарном лечении в РНПЦ неврологии и нейрохирургии, и члены их семей.

В качестве биологического материала для исследования использовалась геномная ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции [6].

1. Поиск крупных экзонных делеций и дупликаций гена PARK2 проводился разработанной нами методикой сравнения интенсивности ПЦР в нескольких экзонах путем анализа образцов с использованием dHPLC (денатурирующей высокоэффективной жидкостной хроматографии).

Аmplификацию экзонов проводили в ходе мультиплексной ПЦР. Экзоны для анализа подбирались с учетом длин, образующихся в процессе амплификации фрагментов (Табл. 1.)

Таблица 1. Длины фрагментов ДНК, полученные в результате амплификации соответствующими парами праймеров [5]

Экзон	Праймеры	Длина фрагмента (п.н.)
2	F ATGTTGCTATCACCATTTAAG R. AGATTGGCAGCGCAGGCGGCA	310
3	F ACATGTCACTTTTGCTTCC R. AGGCCATGCTCCATGCAGACT	427
4	F ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTT R. AGGCAATGTGTTAGTACA	261
5	F ACATGTCCTTAAGGAGTACAT R. TCTCTAATTTCTGGCAAACAG	226
6	F AGAGATTGTTTACTGTGGAAA R. GAGTGATGCTATTTTTAGATC	267
7	F TGCCTTCCACACTGACAGGTA R. TCTGTTCTTCATTAGCATTAGA	240
8	F TGATAGTCATAACTGTGTGTA R. ACTGTCTCATTAGCGTCTATC	206
9	F GCGTGAAATTTGCAGTCA R. AATATAATCCCAGCCCATGTG	271
10	F ATTGCCAAATGCAACCTAATG R. TTGGAGGAATGAGTAGGGCA	165
11	F ACAGGGAACATAAACTCTGAT R. CAACACACCAGGCACCTTCA	293

Для оценки количества ПЦР-продукта проводился сравнительный анализ следующих сочетаний экзонов: 3/7/12, 2/7/8; 3/8/10, 6/11, 4/5, 3/9, 2/3/4.

Условия проведения ПЦР. После денатурации образцов при 95°C в течение 5 минут выполняли 30 циклов амплификации при следующих температурно-временных условиях: 1 мин. денатурации при 95°C, 30 сек отжига при 55°C и 30 сек синтеза при 72°C. На завершающей стадии синтеза пробирки выдерживали 5 мин при 72°C.

Анализ продуктов ПЦР проводили методом DHPLC в жидкостном хроматографе «Varian» при следующих условиях – время разделения 8 мин., температура колонки 500 С, скорость буферного потока 0,45 мл/мин.

2. Определение однонуклеотидных замен в гене PARK2 проводили с использованием метода секвенирования.

Все образцы ДНК были протестированы на наличие точечных мутаций в гене PARK2 методом прямого секвенирования «горячих» экзонов гена.

Смесь для ПЦР с конечным объемом 20 мкл содержала 100 нг ДНК, 1хПЦР буфер, 2,5мМ MgCl, 200 мкМ dATP/dCTP/dTTP/dGTP, 5 пМ праймеров и 0,75 единиц активности Taq-полимеразы.

Для амплификации использовали праймеры, фланкирующие «горячие» экзоны 2, 3, 4 и 7 гена PARK2 (табл. 1.).

Реакцию секвенирования выполняли с наборами ABI PRISM BIGDYE TERMINATOR V1.1 READY REACTION CYCLE SEQUENCING KIT по методике производителя. Для синтеза фрагмента ДНК использовали один из праймеров.

После очистки продукта секвенирующей реакции высушенную пробу растворяли в 20 мкл формамида. Пробы денатурировали 2 мин. при 95°C, после чего пробирки быстро охлаждали во льду. Электрофорез проводили в генетическом анализаторе ABI PRISM 310 при следующих параметрах: длина капилляра – 36 см; заполнение капилляра 4% полимером POP-4™; температура – 500С; время инъекции образца в капилляр 15-30 сек.; время разделения 30 мин.; напряжение 11 кВ.

Обработку результатов выполняли с помощью пакета компьютерных программ DNA Sequencing Analysis Software Version 5.1 (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение

В процессе выполнения работы был проведен молекулярно-генетический анализ образцов ДНК от 52 пациентов с болезнью Паркинсона. Из них у 22 пациентов было раннее начало заболевания (до 45 лет), у 30 – болезнь манифестировала после 45 лет. У 16 пациентов семейный анамнез был отягощен по болезни Паркинсона либо тремору в конечностях, из них у 3 с началом заболевания до 45 лет.

Для идентификации делеций и дупликаций гена PARK2 нами разработан метод сравнительного анализа количества ПЦР-продукта с использованием DHPLC. Принцип метода аналогичен применяющемуся в широко распространенной технологии MLPA (сравнение высоты пиков на фореграмме соответствующих каждому экзону). Однако при использовании DHPLC не требуется флуоресцентного мечения ПЦР-продукта, а также дополнительной пробоподготовки. Это дает значительную экономию средств и времени на проведение анализа.

Молекулярно-генетический анализ на наличие делеций/дупликаций экзонов 2–8, 10 и 11 в гене PARK2 выполнен у всех пациентов.

У 3 пациентов были обнаружены делеции 3 и 4 экзонов гена PARK2. В одном из образцов делеция 3 и 4 экзонов гена PARK2 была выявлена в обеих копиях гена (Рис. 1.). В двух образцах делеция 3 и 4 экзонов присутствует в гетерозиготном состоянии (Рис. 2).

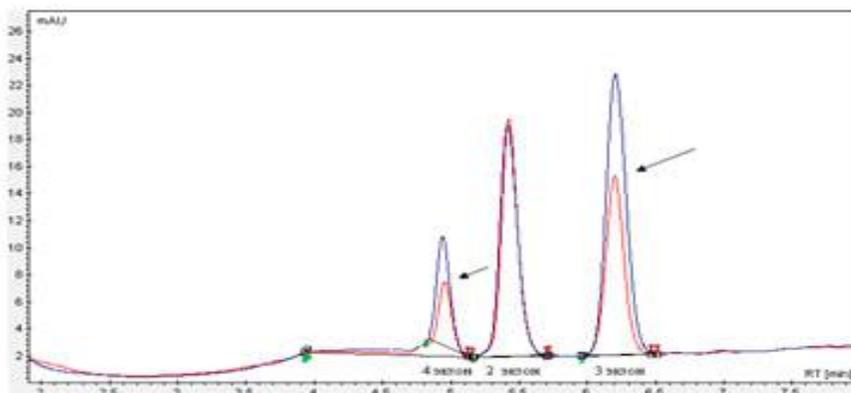


Рисунок 1. Результаты DHPLC-анализа 4, 2 и 3 экзонов гена PARK2  
Стрелками обозначена гомозиготная делеция 3 и 4 экзонов.  
У пациента снижена интенсивность пиков, соответствующих 3 и 4 экзонам по сравнению с нормальным образцом.

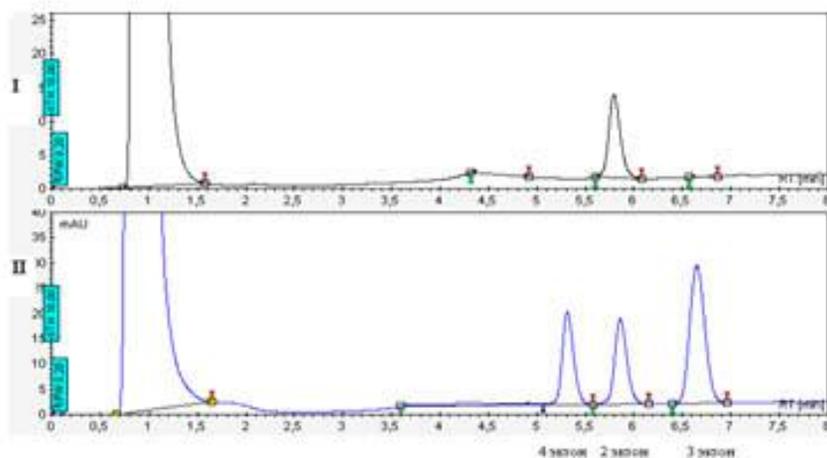


Рисунок 2 . Результаты DHPLC-анализа 4, 2 и 3 экзонов гена PARK2  
У пациента I отсутствуют пики, соответствующие экзонам 3 и 4.  
У пациента II видны пики, соответствующие экзонам 4, 2, 3, что соответствует норме.

Наиболее частыми генетическими дефектами гена PARK2 являются экзонные перестройки. Чаще других встречаются делеции 2-6 экзонов в различных сочетаниях [7, 8, 9]. В нашей группе делеция 3 и 4 экзонов обнаружена в 4 хромосомах у 3 пациентов. Данная делеция встречается также и в других популяциях мира: в США (у .]9[4 человек из 559 обследованных) [7], во Франции (у 3 из 172 пациентов) Возможно, что в Беларуси данный тип перестройки является доминирующим и может быть связан с «эффектом основателя».

Генетические дефекты гена PARK2 включают не только делеции и дупликации одного или нескольких экзонов, но и однонуклеотидные мутации в кодирующей части гена и в сайтах сплайсинга. Они являются ответственными за развитие 50% случаев аутосомно-рецессивного ювенильного паркинсонизма и 10-20% случаев болезни .]3[Паркинсона с ранним началом

Для идентификации однонуклеотидных замен в гене PARK2 использовали метод прямого секвенирования «горячих» экзонов. На сегодняшний день в гене выявлено около 30 различных мутаций и более 90% из них находятся в экзонах 2, 3, 4 и 7. Исходя из этого, нами был выполнен молекулярно-генетический анализ на наличие точечных мутаций именно этих экзонов.

Всего было просеквенировано 204 фрагмента ДНК. Мутации с установленным патогенным эффектом выявлены у двух пациентов, один из них является компаундной гетерозиготой по двум мутациям в 7 экзоне N273S и R275W (Рис. 3). У этого пациента заболевание манифестировало в 24 года.

У второго пациента установлено гетерозиготное носительство мутации R275W (Рис. 3). Примечательно, что этот же пациент имеет делецию 3 и 4-го экзонов,

т.е. является компаундной гетерозиготой по экзонной делеции и точечной мутации. У этого пациента болезнь манифестировала в 30 лет.

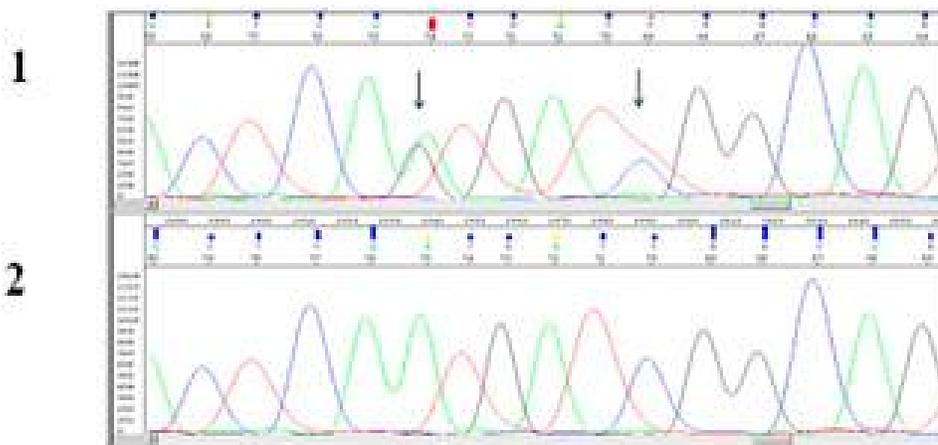


Рисунок 3. Результаты секвенирования 7-го экзона гена PARK2 у двух пациентов с болезнью Паркинсона.

1 – Образец ДНК с мутациями N273S и R275W (стрелками показаны мутантные аллели),

2 - Нормальная последовательность нуклеотидов.

Следует отметить, что мутация R275W, обнаруженная нами у двух пациентов, является одной из наиболее часто выявляемых в европейских популяциях точечных мутаций гена PARK2, лежащих в основе развития ювенильного паркинсонизма. Что касается нуклеотидной замены с.919 A>G, приводящей к мутации N273S, она была ранее описана в единственном случае у пациента из Франции [9].

В обоих случаях членам семей пробандов было предложено молекулярно-генетическое обследование на наличие вышеописанных мутаций.

В 4 экзоне у одного из пациентов выявлена также однонуклеотидная замена с.601G>A, которая вызывает замещение аминокислоты серина на аспарагин (S167N) в белковой молекуле. Показано, что с аналогичной частотой она встречается и в группе контроля, поэтому не относится к патогенетически значимым мутациям [9].

Кроме экзонных мутаций, обнаружено 4 различных интронных полиморфизма (A), которые являются нейтральными, >G, IVS7-35G>T, IVS7-68C>C, IVS3-20C>(IVS2+25T и встречались у большинства обследованных (Табл. 2).

Таблица 2. Интронные полиморфизмы в гене PARK2, выявленные у пациентов с болезнью Паркинсона

Экзон	Название замены	Число пробандов
2	IVS2-25 t>c	21 (4 в гомозиготной форме, 15 в гетерозиготной)
4	IVS3-20 c>t	2 (в гетерозиготной форме)
8	IVS7-68 c>g	7 (все в гомозиготной форме)
8	IVS7-35_g>a	7 (5 в гетерозиготной форме, 2 в гомозиготной)

Большинство авторов сходятся во мнении, что сочетание нескольких полиморфных аллелей «характеризуется отчетливым аддитивным эффектом в отношении риска . Нами такое]1[развития болезни Паркинсона с ранним началом симптомов» сочетание обнаружено у 7 пациентов (6 человек имели по 2 полиморфизма, 1 человек – 3 полиморфизма в различных интронах гена PARK2). Мы считаем данный вопрос дискуссионным, и сочетание нескольких однонуклеотидных полиморфизмов гена PARK2 у пациентов не рассматриваем как фактор развития болезни Паркинсона.

#### Выводы

1. При изучении молекулярно-генетической природы ранней и ювенильной форм болезни Паркинсона мутации гена PARK2 обнаружены у 4 из 52 пациентов: две однонуклеотидные замены в гетерозиготном состоянии R275W и N273S - у одного пациента; замена R275W и делеция 3 и 4 экзонов (обе мутации в гетерозиготной форме) - у одного пациента; гомозиготная делеция 3 и 4 экзонов - у одного пациента; гетерозиготная делеция 3 и 4 экзонов - у одного пациента. У всех этих пациентов с установленным генетическим дефектом болезнь манифестировала в раннем возрасте 2-3 десятилетия жизни. Возможно, что в Беларуси обнаруженная делеция 3 и 4 экзонов является доминирующим типом мутаций и может быть связана с «эффектом основателя».

2. У 27 из 52 пациентов были обнаружены однонуклеотидные замены в различных а), которые>g, IVS7-35g>t, IVS7-68c>c, IVS3-20c>сочетаниях (S167N, IVS2+25t встречаются с одинаковой частотой как в группе обследования, так и в группе контроля. Следовательно, они не являются генетически значимыми и относятся к нейтральным полиморфизмам.

Таким образом, изучение молекулярно-генетической природы ранней и ювенильной форм болезни Паркинсона проведено в Республике Беларусь впервые. Поскольку данное заболевание имеет мультифакториальную природу и является генетически гетерогенным, установление генетических причин его возникновения в каждом конкретном случае дает возможность определить наличие генетического дефекта не только у пациентов, но и у членов их семей, своевременно начать профилактику и лечение бессимптомным носителям мутантных аллелей.

## Литература

1. Джурич, Г. Влияние комбинированных полиморфизмов в генах CYP2D6, PON1, и ароЕ на риск развития болезни Паркинсона / Г. Джурич [и др.] // Мед. генетика. 2008. С. 25–30.
2. Иллариошкин, С. Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии / С. Н. Иллариошкин, И. А. Иванова-Смоленская, Е. Д. Маркова. М.: МИА, 2002.
3. Иллариошкин, С. Н. Паркинсонизм с ранним началом: лекция / С. Н. Иллариошкин // Нервные болезни. 2006. № 9. С. 14–20.
4. Хидиятова, И. М. Эпидемиология и молекулярно-генетические основы наследственных заболеваний нервной системы в Республике Башкортостан: автореф. дис. на соискание уч. степ. д-ра б.н. / И. М. Хидиятова. Уфа, 2008.
5. Choi, J. M. Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease / J. M. Choi // Neurogenetics. 2008. 9:263–269.
6. Davies, K. E. Human genetic diseases: a practical approach / K. E. Davies // Oxford: IRL press. 1986. P. 56.
7. Foroud, T. Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease / T. Foroud, S. Uniacke, L. Liu // Neurology. 2003. 60:796–801.
8. Gosal, D. Parkinson's disease: the genetics of a heterogeneous disorder / D. Gosal // Eur. J. of Neurology. 2006/13:616–627.
9. Lesage, S. Rare heterozygous parkin variants in French early-onset Parkinson disease patients and controls / S. Lesage, E. Lohmann, F. Tison // J Med Genet. 2008. 45:43–46.
10. Poorkai, P. Parkin mutation analysis in clinic patients with early-onset Parkinson's disease / P. Poorkai // Am. J. Med. Genet. 2004. V. 129. P. 44–50.