

# Раздел 1

## Болезнь Паркинсона и другие формы паркинсонизма

### 1.1. Этиология и молекулярные основы болезни Паркинсона. Экспериментальные аспекты изучения паркинсонизма.

#### Этиология болезни Паркинсона: новые представления и новые вызовы

*С.Н. Иллариошкин*

*Научный центр неврологии РАМН (Москва)*

Эволюция взглядов о причинах БП на протяжении почти 200 лет отражала уровень развития неврологии в тот или иной период времени, пройдя сложный путь от признания исключительно экзогенной природы болезни до абсолютизации роли генетики в ее этиологии. Истина оказалась посередине: на сегодняшний день твердо установлена значимость как экзогенных, так и эндогенных механизмов в развитии БП, причем в разных возрастных группах соотношение этих факторов различно. По современным представлениям, около 5–7% всех случаев БП представлены наследственными (моногенными) формами, тогда как большинство случаев являются спорадическими и имеют мультифакторную природу. В механизмах спорадической формы БП имеет значение специфическое взаимодействие экзогенных воздействий, особенностей генома и системного метаболизма, накладывающихся на возрастной фактор и определяющих в совокупности характер процессов клеточной детоксикации, кругооборота ксенобиотиков и функционирования митохондрий у конкретного индивидуума [13, 48].

#### Средовые факторы

*Нейротоксины.* 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 [34, 37]. Показано, что хроническое системное воздействие ротенона, эпоксимицина и других подобных соединений воспроизводит в эксперименте практически все ключевые клинические, нейрохимические, патоморфологические и молекулярные характеристики БП [27]. Эпидемиологические исследования подтверждают эти заключения. Так, распространенность БП в сельских популяциях среди фермеров оказалась почти в 1,4 раза выше по сравнению с городским населением, а риск БП у работников плантаций – в 1,5–2 раза выше общепопуляционного [16, 48], что может служить подтверждением роли в развитии заболевания пестицидов и других агентов, контакт с которыми по определению выше у занятых в сельскохозяйственном производстве лиц. Риск развития БП возрастает и при употреблении контаминированных пестицидами продуктов, колодезной воды и т.п. [13]. Риск повышается при увеличении продолжительности контакта с пестицидами и, напротив, снижается при использовании элементарных защитных мероприятий (надевание перчаток, смывание токсина водой при его попадании на кожу и т.п.). Молекулярной основой указанной ассоциации служит тот факт, что ряд пестицидов и гербицидов (ротенон, дieldрин, паракват, манеб и др.) могут провоцировать конформационные изменения молекулы клеточного белка

$\alpha$ -синуклеина и существенно ускорять темп формирования в нейронах  $\alpha$ -синуклеиновых фибрилл [2, 27]. Последние являются основным субстратом патоморфологических клеточных маркеров БП – телец и нейритов Леви.

Синдром паркинсонизма вызывают также нейротоксины, которые специфически поражают дофамин-продуцирующие клетки среднего мозга – 6-гидроксидофамин и N-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) [27, 37]. Они взаимодействуют с дофаминорвыми транспортерами, избирательно аккумулируются в нигростриатных нейронах и вызывают их гибель в результате превращения (под влиянием MAO-B) в наиболее токсичные свободнорадикальные метаболиты. Предполагается, что эти соединения могут поступать в организм с пищей, водой, воздухом. Воздействие и других обсуждаемых в литературе предположительно «паркинсонических» нейротоксинов (таких как марганец, железо и соли некоторых других металлов) также определяет повышенный риск развития БП через рассмотренные механизмы – агрегацию  $\alpha$ -синуклеина, повреждение митохондрий и/или индукцию окислительного стресса [16].

Роль экзогенных токсических соединений в происхождении БП подтверждается современными представлениями о наиболее ранних стадиях нейродегенеративного процесса при данном заболевании. Установлено, что еще до манифестации типичных для БП двигательных нарушений патологические синуклеин-позитивные включения выявляются в обонятельных луковицах и нейронах дорсального двигательного ядра блуждающего нерва, после чего они постепенно появляются в более роstralных отделах (ядра шва и ретикулярной формации, голубое пятно, черная субстанция и т.д.) [10]. Более того, в латентном периоде БП четкие нейродегенеративные изменения «паркинсонического» типа (агрегаты  $\alpha$ -синуклеина, тельца и нейриты Леви) выявляются в периферических вегетативных нейронах: в клетках мейсснера и ауэрбахова сплетений кишечника, пре- и паравертебральных ганглиях, в дистальных симпатических терминалях и ганглиях симпатического ствола, нейронах надпочечников, предстательной железы, слюнных желез, кожи и т.д. [5, 7, 12]. Есть основания считать, что вовлечение парасимпатических интрамуральных нейронов кишечника и клеток обонятельных ядер – это наиболее ранние события, которые указывают на возможность вдыхания и/или алиментарного поглощения триггерного патогена [20]. Последующее распространение патологического процесса может происходить по волокнам обонятельного и блуждающего нервов (с поражением соответствующих нейронов каудального ствола), а также по механизмам ретроградного аксонального транспорта (в периферической вегетативной нервной системе).

Большое значение экзогенных воздействий в реализации предрасположенности к БП и многофакторный характер влияния химических соединений на динамику нейродегенеративного процесса подчеркиваются выявлением различных биологически активных веществ, которые могут снижать риск развития БП. К таким доказанным либо предположительным средовым факторам «антириска» БП относятся: табакокурение (обсуждается возможный защитный эффект отдельных компонентов, содержащиеся в табачном дыме); употребление кофе и, возможно, некоторых сортов чая; прием блокаторов кальциевых каналов, нестероидных противовоспалительных средств, больших доз витамина E и др. [4, 34]. Молекулярные механизмы нейропротекции указанных соединений весьма разнообразны и включают воздействие на центральные аденозиновые и каннабиноидные рецепторы, ингибирование внутриклеточно потока ионов  $Ca^{2+}$  через потенциалзависимые нейрональные каналы L-типа, ингибирование активности MAO-B и т.д. Изучение всей патофизиологической палитры сложных взаимодействий потенциальных нейротоксинов и нейропротекторов, определяющих риск поражения моноаминергических нейронов ЦНС, является в настоящее время одним из наиболее перспективных направлений в разработке новых методов лечения БП.

*Прионы и прионная гипотеза.* В самые последние годы было показано, что конформационные изменения молекулы  $\alpha$ -синуклеина, происходящие под влиянием токсического агента (см. выше) либо в результате случайных стохастических причин в стареющих нейронах, могут индуцировать дальнейшую трансинаптическую передачу патологической формы белка от клетки к клетке, что соответствует факту прогрессирования Леви-патологии при БП преимущественно вдоль сформированных нейронных путей [10]. Такая диссеминация аномально конформированных молекул  $\alpha$ -синуклеина при БП имеет определенное сходство с молекулярными механизмами прионных болезней [32].

Прионоподобная динамика нейродегенеративного процесса с участием  $\alpha$ -синуклеина первоначально была постулирована на основании результатов морфологических исследований мозга больных БП, которым за 15–20 лет до смерти в полосатое тело имплантировались фетальные мезенцефалические нейроны. Оказалось, что у этих больных в имплантированных нейронах формировались тельца Леви, что со всей очевидностью свидетельствует о передаче патологического процесса от «больных» нейронов пациента вводимым извне интактным клеткам [11]. Возможность передачи  $\alpha$ -синуклеиновой патологии от нейрона к нейрону была продемонстрирована и на клеточных культурах [31]. Таким образом, патологическая конформация  $\alpha$ -синуклеина, трансинаптически передаваемая от нейрона к нейрону *in vivo* и *in vitro*, саморепликация аномальных молекул  $\alpha$ -синуклеина, амилоидный характер его агрегатов в цитоплазме нейронов, а также возможный алиментарный путь распространения пато-

генного белка — это все типичные характеристики прионных болезней. Но до последнего времени в этой цепочке не доставало главного — доказательства *инфекционности* патологической изоформы  $\alpha$ -синуклеина.

И вот совсем недавно первые такие данные были получены [31]. Установлено, что введение в striatum очищенных фибрилл  $\alpha$ -синуклеина вызывает у мышей дегенерацию клеток черной субстанции с появлением патологических синуклеиновых агрегатов и двигательных нарушений — признак распространения патологии вдоль проводящих путей в ЦНС [26]. Указанный эффект не наблюдается у трансгенных мышей с подавленной экспрессией собственного  $\alpha$ -синуклеина (т.е. у нулл-мутантов по гену *SNCA*), что подтверждает необходимость взаимодействия патологического  $\alpha$ -синуклеина с его нормальной нейрональной изоформой для распространения «паркинсонической» нейродегенерации. Напротив, инъекции патологической изоформы  $\alpha$ -синуклеина в мозг мышей с гиперэкспрессией гена *SNCA* ускоряют развитие в мозге синуклеинопатии и гибель животных [26]. Внутримозговая инокуляция экстракта человеческих телесц Леви или глиальных синуклеиновых агрегатов вызывает появление распространенных агрегатов  $\alpha$ -синуклеина и развитие двигательных нарушений у крыс [49]. Тот же результат получен у макака, причем нейродегенерация после инокуляции в мозг экстрактов  $\alpha$ -синуклеина неуклонно нарастала на протяжении 4–17 мес. наблюдения [35].

Аналогично  $\alpha$ -синуклеину, в самое последнее время была показана трансмиссивность и ряда других «неприонных» белков —  $\beta$ -амилоида, тау, TDP-43, ответственных за развитие болезни Альцгеймера, болезни двигательного нейрона и других нейродегенеративных патологий [Guo, Lee, 2014]. Однако в недавней работе Irwin et al. (2014) не удалось показать ни повышенной заболеваемости болезнями Паркинсона/Альцгеймера среди большой группы реципиентов трупного гормона роста, ни патологического накопления  $\alpha$ -синуклеина,  $\beta$ -амилоида или фосфорилированного тау-белка в аутопсийных тканях гипофиза пациентов с нейродегенеративными заболеваниями [19]. Поэтому, в отличие от классических прионных болезней, пока нет данных о прямой инфекционной передаче БП или болезни Альцгеймера через контаминированный биологический материал.

Таким образом, гипотеза о прионной природе БП и других указанных заболеваний представляется одним из наиболее значительных достижений нейронаук последних лет, но она нуждается в дальнейшем изучении и более детальном, многократно воспроизведенном экспериментальном обосновании. Тем не менее, уже сейчас указанные «революционные» представления о генезе БП позволяют предлагать ряд новых молекулярных методов терапии. Так, на прошедшем в 2014 году в Стокгольме 18-м Конгрессе по болезни Паркинсона и расстройствам движений Virginia Lee обобщила результаты исследований своей группы [46] и показала, что использование моноклональных антисинуклеиновых антител SYN303 предотвращает трансмиссию патологического белка от нейрона к нейрону за счет подавления захвата «прионоподобного»  $\alpha$ -синуклеина окружающими интактными нейронами. Применение таких антител у трансгенных мышей сопровождается уменьшением формирования Леви-патологии в мозге, что, возможно, открывает новый путь в лечении БП.

*Черепно-мозговая травма.* Хорошо известна особая форма вторичного паркинсонизма, представляющая собой разновидность посттравматической энцефалопатии и возникающая либо в результате множественных повторных сотрясений мозга в группах повышенного риска («мозг боксера» и др.), либо в результате тяжелого (в том числе однократного) травматического повреждения базальных ганглиев и/или их связей [21]. Эти данные послужили основанием для проведения большого числа эпидемиологических исследований, посвященных возможной взаимосвязи черепно-мозговой травмы и «истинной» БП. Примерно в трети всех исследований была выявлена статистически значимая ассоциация БП с наличием у пациента в анамнезе черепно-мозговых травм различной тяжести [14, 44]. Интересно, что даже при незначимой ассоциации практически во всех сериях наблюдений у больных БП частота событий, связанных с перенесенной черепно-мозговой травмой, была выше, чем в контроле [14], что служит косвенным подтверждением роли черепно-мозговой травмы в формировании риска развития БП. Считается, что этот повышенный риск может иметь чисто механическое объяснение (ротационное повреждение волокон мезенцефальных нейронов) либо реализовываться через нарушение гематоэнцефалического барьера, соответствующий иммунный ответ со стороны вещества мозга, активацию реакций «острой фазы» и гиперэкспрессию белков, провоцирующих образование характерных для БП  $\alpha$ -синуклеиновых фибриллярных включений в цитоплазме нейронов.

### Возрастные и конституциональные факторы

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% [4, 22]. 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) [22]. Именно возрастным фактором объясняются грозные прогнозы ВОЗ о том, что к 2030-му году ожидается удвоение числа больных БП, а к 2050-му увеличение этих цифр

уже вчетверо – все это вследствие возраст-зависимого характера БП и тенденции к неуклонному постарению населения развитых стран мира.

Причины, по которым БП ассоциирована с пожилым возрастом, достаточно хорошо изучены и связаны с истощением пластических способностей ЦНС по мере старения [1, 2]. Состояние организма в зрелом возрасте и в старости характеризуется:

- хроническим окислительным стрессом;
- накоплением мутаций митохондриальной ДНК;
- падением уровня глутатиона и других компонентов антиоксидантной защиты;
- угнетением функции убиквитин-протеасомной системы;
- снижением способности нейронов к активизации стрессорного 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.

Повышенный риск развития БП связан и с рядом других конституциональных факторов: мужским полом (снижение риска БП у женщин предположительно связывают с защитным эффектом эстрогенов); б) рыжим цветом волос (красноватый оттенок возникает при дисбалансе пигментов – избытке феомеланина и недостатке зернистого меланина, а последний как раз имеет прямое отношение к биохимизму нигральных нейронов); в) избыточной массой тела (возможно, этот фактор вторичен по отношению к физической активности – известно, что высокая физическая активность снижает риск БП).

#### Генетические факторы и их взаимодействие с факторами внешней среды

Роль наследственности в возникновении БП предполагалась еще в начале прошлого столетия. Однако многочисленные попытки применения классического близнецового метода, направленные на подтверждение этого предположения, не показывали существенных различий конкордантности по БП между парами моно- и dizиготных близнецов. И только в исследованиях с использованием ПЭТ и ОФЭКТ, когда стало возможным диагностировать латентную фазу нигральной нейродегенерации, была продемонстрирована высокая конкордантность среди монозиготных близнецов (55%) по сравнению с dizиготными (18%), преимущественно для лиц с ранним началом БП [39]. Тем самым роль наследственности в этиологии БП получила свое подтверждение.

Несомненная наследственная предрасположенность к развитию БП была четко установлена также и в большом количестве последних эпидемиологических и популяционных исследований [3, 4, 28]. 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.

Наиболее убедительные доказательства значимости генетики в развитии БП были получены благодаря наблюдениям семей, в которых заболевание наследовалось по четким менделевским законам (чаще всего по аутосомно-доминантному и аутосомно-рецессивному типам). Именно в этих редких наследственно-семейных случаях БП были идентифицированы гены и соответствующие белковые продукты, позволившие раскрыть ключевые звенья патобиохимического каскада при БП [3, 37, 39, 42].

На сегодняшний день известны генетические локусы около 20 наследуемых форм БП, что свидетельствует о выраженной генетической гетерогенности первичного паркинсонизма. Наибольшее значение имеют три наследственных формы БП:

1) *PARK1* – аутосомно-доминантная форма, обусловленная мутациями в гене  $\alpha$ -синуклеина (*SNCA*). В единичных семьях описаны точковых мутации в гене  $\alpha$ -синуклеина, однако чаще при *PARK1*-форме БП и в части случаев деменции с тельцами Леви встречается полная мультипликация соответствующей области хромосомы 4q21. Белок  $\alpha$ -синуклеин имеет повышенную склонность к агрегации, а в фибриллярном полимеризованном виде он является основным компонентом телец Леви. Универсальное значение в патогенезе семейных и спорадических случаев БП имеют изменения нативной конформации  $\alpha$ -синуклеина, происходящие под влиянием наследуемых мутаций либо разнообразных экзогенных нейротоксических факторов, рассмотренных выше.

2) *PARK2* – аутосомно-рецессивная форма, обусловленная мутациями в гене паркина (*PRKN*). Мутации данного гена являются наиболее частой причиной раннего (в том числе ювенильного) аутосомно-рецессивного паркинсонизма: ими обусловлены более 50% семейных и около 15% спорадических случаев первичного паркинсонизма с ранним началом симптомов. Высказывается предположение, что носительство мутаций паркина даже в гетерозиготном состоянии может являться значимым (хотя и не абсолютным) фактором риска развития БП. Бе-



лок паркин представляет собой убиквитин-лигазу, функция которой заключается в доставке аномальных субстратов в протеасомный комплекс клетки для расщепления. В настоящее время паркин рассматривается в качестве поливалентного нейропротекторного агента, имеющего ключевое значение для выживания дофаминергических нейронов при воздействии различных нейротоксинов.

3) *PARK8* – аутосомно-доминантная форма, обусловленная мутациями в гене *LRRK2*. Ген *LRRK2* (*Leucine-rich repeat kinase 2*) имеет чрезвычайно большое значение в развитии БП в общей популяции. Показано, что те или иные мутации в нем обуславливают 1–7% всех спорадических и семейных случаев БП в европейских популяциях и 20–40% в некоторых популяциях ближневосточно-средиземноморского региона. Белковый продукт гена, дардарин, является цитоплазматической ГТФ-зависимой киназой, предположительно вовлеченной в процессинг нейрональных белков и функционирование митохондрий.

Все остальные генетические формы БП остаются редкими или малоизученными, и их место в общем спектре первичного паркинсонизма в различных популяциях мира до конца не определено. Так, гены *PINK1* (форма *PARK6*) и *DJ-1* (*PARK7*) связаны с развитием ранней аутосомно-рецессивной БП, но доля пациентов с мутациями в данных генах среди всех случаев семейного первичного паркинсонизма составляет не более 4–5%, а среди спорадических случаев БП – лишь около 1% [28]. Формы *PARK9*, *PARK14*, *PARK15*, *PARK19* и *PARK20* описаны в единичных семьях и характеризуются особыми фенотипами – сочетанием паркинсонизма с дистонией, выраженной спастичностью, когнитивными нарушениями, надъядерным параличом зрения, эпилептическими припадками (синдром Куфора–Ракеба, паллидо-пирамидный синдром и т.д.). Очевидно, что эти редкие аутосомно-рецессивные синдромы имеют мало общего с классической БП.

Генетика вносит определенный вклад и в развитие спорадических случаев первичного паркинсонизма через формирование генетической предрасположенности к данному заболеванию [42]. Следует отметить, что до настоящего времени не установлено выраженной предрасполагающей роли какого-либо одного из изучавшихся генов-кандидатов в развитии спорадической БП. Наиболее доказанными генетическими факторами, определяющими достаточно значимый риск развития заболевания в различных популяциях, являются:

- динуклеотидный Rep1-полиморфизм в промоторной области гена *SNCA* – показано, что длинные аллели повышают риск БП в 1,4 раза (длинные аллели промотора повышают экспрессию гена, что сопровождается увеличением концентрации  $\alpha$ -синуклеина и его повышенной агрегацией в клетке);
- гетерозиготные мутации в гене *GBA* (кодирующем лизосомальный фермент глюкоцереброзидазу) – этот ген рассматривается в настоящее время как один из ведущих факторов развития первичного паркинсонизма в популяции, поскольку носительство мутаций в нем ассоциировано с 5-кратным увеличением риска БП и, помимо этого, определяет высокую вероятность развития когнитивных нарушений при БП;
- полиморфизмы и гаплотипы в гене *LRRK2*;
- полиморфизмы в гене *MAPT*, кодирующем белок цитоскелета нейронов тау;
- полиморфизмы в ряде генов клеточной детоксикации и репарации (параоксоназа, аполипопротеин E, паркин и др.);
- различные полиморфные варианты в локусе *PARK16*.

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.

В самые последние годы значительное развитие получили технологии полногеномного сканирования, позволяющие осуществлять тотальный скрининг вариабельных участков генома с целью поиска возможных ассоциаций с теми или иными заболеваниями. Недавние результаты полногеномного сканирования при спорадической БП свидетельствуют о существовании более 10 новых генетических локусов, ассоциированных с данным заболеванием (*GAK*, *BST1*, *HLA-DRB5*, *SYT11* и др.) [6, 24, 33]. Установленный генетический профиль предрасположенности к БП имеет определенные популяционные особенности, связанные, по-видимому, с эффектами многочисленных генов-модификаторов, аллельные частоты которых могут существенно различаться у лиц разных этнических групп [41]. Показано, что если учесть генетический профиль различных людей по большому числу различных локусов паркинсонизма, то риск развития БП у носителей «благоприятных» и «неблагоприятных» комбинаций аллельных вариантов всей совокупности генов может различаться в 3–4 раза [International Parkinson's Disease Genomics Consortium, 2011]. Все эти результаты на новом уровне подтверждают важную роль генетической составляющей в этиологии спорадической БП.

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 клеточной детоксикации [48]. Например, установлено возрастание патогенетической роли пестицидов у «плохих метаболизаторов» фосфорорганических соединений – т.е. у лиц, имеющих неблагоприятный аллель гена

цитохромоксидазы *CYP2D6*. Аналогичным образом, чувствительность к пестицидам повышается при наличии неблагоприятного промоторного варианта гена  $\alpha$ -синуклеина (*SNCA*), причем это влияние носит взаимный характер, поскольку *SNCA*-ассоциированный риск БП модифицируется в зависимости от контакта с пестицидами на протяжении жизни [13]. Известный протекторный эффект курения в отношении риска БП также опосредован генетическими факторами, например, носительством определенных аллелей генов *MAO-B* и *GSTP1*.

Сходная картина характерна и для выявленной ассоциации БП с черепно-мозговой травмой. Показано, что такая ассоциация наиболее сильна в тех случаях заболевания, которые характеризовались положительным семейным анамнезом и/или дополнительным воздействием пестицидов и других известных «паркинсонических» нейротоксинов [44]. Полученные в последние годы данные свидетельствуют о том, что черепно-мозговая травма повышает риск БП не вообще, а исключительно у лиц, являющихся носителями специфических полиморфизмов в генах предрасположенности и, в частности, длинного (неблагоприятного) Rep1-промоторного аллеля в гене *SNCA* [14, 15].

Таким образом, воздействие средовых нейротоксинов с определенными физико-химическими свойствами, черепно-мозговых травм и других экзогенных факторов может служить триггером каскада молекулярных событий, ведущих к развитию БП, только у конкретных индивидов, имеющих высокую предрасположенность к болезни в силу их неблагоприятного генетического профиля. Это хорошо иллюстрирует взаимодействие генетики и среды и дает важный ключ к пониманию механизмов развития спорадической формы БП.

### Молекулярные механизмы нейродегенеративного процесса при БП

В патогенезе нейродегенеративного процесса при БП основное значение придается протеолитическому стрессу, дисфункции митохондрий и нарушению энергетического метаболизма нейронов [18, 25].

*Протеолитический стресс и БП.* Протеолитический стресс заключается в нарушении системы контроля за биогенезом и протеолитической деградацией разнообразных нейрональных белковых субстратов — так называемой «системы контроля качества белков». Это фактор представляет собой универсальный механизм повреждения клетки при нейродегенеративных заболеваниях [2]. При БП ключевая роль в этом процессе отводится белку -синуклеину, фибриллизация которого является первым этапом формирования в гибнущих нейронах телец и нейритов Леви. Различные по характеру мутации гена  $\alpha$ -синуклеина провоцируют изменения конформации белка либо повышают его экспрессию в клетке, что сопровождается резким усилением присущей  $\alpha$ -синуклеину агрегационной способности, формированием в нейронах патологических включений и индукцией апоптоза [30, 45]. Повышенной экспрессии  $\alpha$ -синуклеина может способствовать также носительство определенных полиморфных аллелей в промоторной области гена, что, как уже рассматривалось выше, является одним из важных механизмов генетической предрасположенности к развитию спорадической БП.

В норме деградация образующихся в клетке  $\alpha$ -синуклеиновых агрегатов должна происходить по двум путям: лизосомному и внелизосомному.

Лизосомная аутофагия — неспецифический процесс биodeградации крупных белковых комплексов и целых мембранно-клеточных фрагментов. Лизосомная аутофагия происходит с участием большого числа протеолитических ферментов, гены которых могут участвовать в формировании предрасположенности к БП. Так, возможным механизмом действия одного из генов риска БП — гена *GBA*, кодирующего фермент глюкоцереброзидазу, предположительно является именно нарушение лизосомной биodeградации аномальных белков вследствие снижения активности данного фермента [50]. Еще один лизосомный трансмембранный белок, АТР13А2, ответствен за PARK9-форму аутосомно-рецессивной БП. Показано, что мутантные и патологически измененные молекулы -синуклеина способны блокировать процесс лизосомной аутофагии как в отношении самих себя, так и в отношении других субстратов [36].

Внелизосомный путь является более селективным и тонким. Он предполагает мечение аномальных молекул особым сигнальным пептидом убиквитином и доставку образующегося субстрата в специальный протеолитический комплекс (протеасому) для деструкции, что происходит с участием белков-шаперонов [2, 36]. Этот естественный механизм истощается в случае мутаций генов  $\alpha$ -синуклеина, паркина, UCH-L1 и др., поскольку все эти белки являются элементами убиквитин-протеасомного комплекса клетки [9]. При спорадической форме БП ведущую роль в развитии синуклеинопатии могут играть дефицит комплекса I дыхательной цепи митохондрий и окислительный стресс (см. далее) в нигростриатных дофаминергических нейронах: эти факторы предрасполагают к нарушению конформации  $\alpha$ -синуклеина, повышению его экспрессии и патологической агрегации, что делает клетку еще более ранимой по отношению к свободнорадикальному повреждению [2].

В последние годы большое значение в поддержании целостности нейрона придается обезвреживанию и удалению продуктов поврежденных митохондрий — эта особая разновидность клеточной аутофагии обозначается термином *митофагия*. Показано, что в паркин-дефицитных нейронах ключевым механизмом дегенерации является нарушение «системы контроля качества белков» как раз в отношении деградируемых митохондриальных

субстратов [25]. При мутациях в гене *PINK1* также страдает кругооборот и биодegradация поврежденных митохондрий [18]. Предполагается, что патология тонких механизмов митофагии может иметь универсальное значение в молекулярном патогенезе БП.

Важную защитную роль в клетке играет система молекулярных шаперонов — специальных молекул преимущественно пептидной природы, которые контролируют на всем протяжении процессы укладки клеточных белков, направляя их свертывание по правильному пути, предотвращая аномальную агрегацию и тем самым защищая клетку от фатальных последствий белковых дефектов. При нейродегенеративных заболеваниях способность клеток активизировать стандартный стрессорный ответ и усиливать экспрессию шаперонов существенно снижается [2], что может отражать истощение этих факторов клеточной защиты на определенной стадии патологического процесса. Нарушение механизмов шаперонной защиты может быть связано и с мутациями соответствующих генов, кодирующих ключевые компоненты этой системы — например, гена *DJ-1*, ответственного за синтез митохондриального белка-шаперона с антиоксидантными свойствами.

*Дисфункция митохондрий и окислительный стресс при БП.* Митохондриальная дисфункция и окислительный стресс имеют решающее значение в патогенетическом каскаде БП. В недавнем масштабном мультицентровом исследовании, объединившем данные мета-анализов полногеномных экспрессионных исследований и результаты изучения транскриптомов нейронов черной субстанции, была установлена связь БП с 10 молекулярными путями биоэнергетического метаболизма, включая метаболизм глюкозы и митохондриальное окислительное фосфорилирование [51].

Установлено, что в клетках черной субстанции и тромбоцитах больных БП имеет место повреждение субъединиц и дефицит активности I комплекса дыхательной цепи митохондрий [23]. В нигральных нейронах больных БП выявлен также дефицит митохондриального ферментативного комплекса  $\alpha$ -кетоглутарат-дегидрогеназы [28]. Как уже отмечалось выше, риск БП достоверно повышается при воздействии токсинов и промышленных веществ, ингибирующих дыхательную цепь митохондрий.

Одним из источников митохондриальной недостаточности в дофаминергических нигростриатных нейронах при БП может служить повреждение митохондриального генома: показано, что нейроны черной субстанции избирательно характеризуются высокой предрасположенностью к накоплению большого числа делеций митохондриальной ДНК [8]. Следует добавить, что дофаминергические нейроны обладают рядом специфических биохимических особенностей, которые способствуют развитию окислительного стресса и повреждению митохондрий, либо определяют особую энергетическую зависимость этих клеток. К таким особенностям относятся: агрессивный окислительный характер метаболизма катехоламинов, в избытке имеющихся в этих клетках; повышенное содержание железа; недостаточность систем антиоксидантной защиты (глутатиона); наличие чрезвычайно интенсивно ветвящихся аксонов (до ста тысяч сайтов синаптической секреции на один нейрон — огромная энергетическая нагрузка) [43, 45]. Все эти факторы, как уже было представлено выше, становятся особенно значимы по мере старения нигростриатной и других систем мозга.

В числе причин селективной ранимости дофаминергических нейронов называют присущие им нейрофизиологические характеристики — наличие постоянной, непрерываемой спайковой активности в состоянии бодрствования, а также широкая форма спайков, способствующая рассеиванию ионного градиента, особенно для ионов кальция [43]. При этом нигральные нейроны имеют низкую экспрессию кальций-связывающих белков, обеспечивающих удержание кальция в клетке (что снижает затраты на его энергоемкую доставку внутрь нейронов) и буферизацию избыточных ионов кальция в условиях цитотоксической окислительной патологии.

Связь митохондрий и окислительного стресса с патогенезом БП подчеркивается прямой или опосредованной митохондриальной ролью основных генов паркинсонизма. Так,  $\alpha$ -синуклеин, паркин, дардарин, DJ-1, PINK1, HTRA2 и некоторые другие продукты генов паркинсонизма имеют большое значение в поддержании целостности митохондриального комплекса, о чем свидетельствуют многочисленные экспериментальные данные [37, 47]. Показано, что в условиях клеточного стресса мутации PINK1 ведут к утрате митохондриального мембранного потенциала, а у животных с нокаутированными генами  $\alpha$ -синуклеина, паркина или DJ-1 изменяется чувствительность к действию митохондриальных токсинов и повышается уровень маркеров окислительного стресса [38]. Выявлено тесное комплементарное взаимодействие  $\alpha$ -синуклеина, паркина, DJ-1 и PINK1 в поддержании жизнеспособности нигростриатных нейронов в условиях окислительного стресса [45], что может служить доказательством существования в нейронах общих метаболических путей, повреждающихся при развитии «паркинсонического» нейродегенеративного процесса.

В последнее время показано, что экспрессия большого числа генов энергетического и окислительного метаболизма в клетке модулируется транскрипционным коактиватором PGC-1 $\alpha$ , выполняющим роль универсального регулятора митохондриального биогенеза [18]. В норме белок PGC-1 $\alpha$  находится под негативным контролем особого молекулярного комплекса паркин/PARIS, и при патологии паркина (генетической либо вторичной) это подавление становится избыточным. Таким образом, одной из причин нарушения клеточной биоэнергетики в

нигральных нейронах при БП может быть репрессия PGC-1 $\alpha$ , связанная с особой чувствительностью этих клеток к минимальной дисфункции паркина и паркин-ассоциированных реакций.

В механизмах поражения нейронов при БП определенное значение придается и ряду других событий – структурной и функциональной дизрегуляции цитоскелета (о чем свидетельствует, например, патология тау-белка), нарушению аксонального транспорта, дефектам эпигенетической модификации ДНК, а также синуклеин-опосредованной активации микроглии (в нигральных нейронах выявляется значительное повышение уровня провоспалительных цитокинов, источником которых являются глиальные клетки, и эти процессы усиливаются под действием некоторых «паркинсонических» мутаций). [17, 29, 39]. Все указанные нарушения логично вписываются в общую концепцию патогенеза БП: так, например, функционирование микротубулярного цитоскелетного аппарата и аксональный транспорт являются чрезвычайно энергозависимыми процессами, в связи с чем они быстро становятся молекулярной мишенью при развивающейся патологии митохондрий. В свою очередь, патология цитоскелета и аксонального транспорта приводит к задержке  $\alpha$ -синуклеина в соме нейрона и дальнейшему ускорению формирования телец Леви, замыкая тем самым своеобразный порочный круг [10].

Снижение уровня АТФ в нейронах, обусловленное дисфункцией митохондрий и окислительным стрессом, служит неспецифическим индуктором эксайтотоксических процессов. Энергетический дефицит ведет к частичной деполяризации нейрональной мембраны и снятию потенциал-зависимого магниевого блока глутаматных NMDA-рецепторов, в результате чего происходит их избыточная активация под воздействием обычных концентраций синаптического глутамата. Все это сопровождается резким увеличением трансмембранного кальциевого тока в клетку, высвобождением ионов Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо и инициацией каскада Ca<sup>2+</sup>-зависимых нейротоксических и деструктивных реакций, в первую очередь – высвобождением цитохрома С и активацией ряда сигнальных протеаз (каспаз и др.) [37, 40]. В свою очередь, нарушение внутриклеточного кальциевого гомеостаза, окислительное повреждение клеточных мембран и активация сигнальных протеаз являются решающими факторами, запускающими реакции запрограммированной гибели клеток – апоптоза.

#### Литература

1. Завалишин И.А., Яхно Н.Н., Гаврилова С.И. (ред.) Нейродегенеративные болезни и старение. М.: 2001.
2. Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003.
3. Иллариошкин С.Н., Загорская Т.Б., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. Генетические аспекты болезни Паркинсона. Неврол. журн. 2002; 5: 47-52.
4. Левин О.С., Докадина Л.В. Эпидемиология паркинсонизма и болезни Паркинсона. Неврол. журн. 2005; 5: С.41-49.
5. Adler C.Y., Dugger B.N., Hinni M.L. et al. Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. Neurology 2014; 82: 858-864.
6. Alonso-Navarro H., Jimenez-Jimenez F.J., Garcia-Martin E., Agundez J.A.G. Genomic and pharmacogenomics biomarkers of Parkinson's disease. Cur. Drug Metab. 2014; 15: 129-181.
7. Beach T.G., Adler C.H., Sue L.I. et al. Multi-organ distribution of phosphorylated  $\alpha$ -synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. Acta Neuropathol. 2010; 119: 703-713.
8. Bender A., Schwarzkopf R.-M., McMillan A. et al. Dopaminergic midbrain neurons are the prime target for mitochondrial DNA deletions. J. Neuro. 2008; 255: 1231-1235.
9. Breydo L., Wu J.W., Uversky V.N.  $\alpha$ -synuclein misfolding and Parkinson's disease. Biochim. Biophys. Acta 2012; 1822: 261-285.
10. Del Tredici K., Braak H. Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. Mov Disord. 2012; 27: 597-560.
11. Desplats P., Lee H.J., Bae E.J. et al. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009; 106: 13010-13015.
12. Folgoas E., Leboviev T., Leclair-Visonneau L. et al. Diagnostic value of minor salivary glands biopsy for the detection of Lewy pathology. Neurosci. Lett. 2013; 551: 62-64.
13. Gatto N.M., Rhodes S.L., Manthripragada A.D. et al.  $\alpha$ -Synuclein gene may interact with environmental factors in increasing risk of Parkinson's disease. Neuroepidemiology 2010; 35: 191-195.
14. Gershanik O.S. Trauma and Parkinson's disease. In: Koller W.C., Melamed E. (eds). Handbook of Clinical Neurology, Vol.84: Parkinson's disease and related disorders. Part II. Elsevier, 2007: 487-499.
15. Goldman S.M., Kamel F., Bhudikanok et al. Alpha-synuclein (SNCA) genotype modifies the association between head injury and Parkinson's disease (PD). Neurology 2009; 72 (Suppl. 3): S23.005.
16. Gorell J.M., Johnson C.C., Rybsky D.A. et al. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. Neurology 1998; 50: 1346-1350.
17. Habibi E., Masoudi-Nejad A., Abdolmaleky H.M., Haggarty S.J. Emerging roles of epigenetic mechanisms in Parkinson's disease. Funct. Integr. Genomics 2011; 11: 523-537.
18. Hirsch E.C., Jenner P., Przedborski S. Pathogenesis of Parkinson's disease. Mov. Disord. 2013; 28: 24-30.
19. Irwin D.J., Abrams J.Y., Schonberger L.B. et al. Evaluation of potential infectivity of Alzheimer and Parkinson disease proteins in recipients of cadaver-derived human growth hormone. JAMA Neurol. 2013; 70: 462-468.
20. Jellinger K.A. Synuclein deposition and non-motor symptoms in Parkinson disease. J. Neurol. Sci. 2011; 310: 107-111.
21. Jordan B.D. Chronic traumatic brain injury associated with boxing. Semin. Neurol. 2000; 20: 179-185.
22. Kasten M., Chade A., Tanner C.M. Epidemiology of Parkinson's disease. In: Parkinson's disease and related disorders. Advances in neurology, Vol.83, Part I (ed. W.C.Koller, E.Melamed). Edinburgh: Elsevier, 2007: 129-151.
23. Keeney P.M., Xie J., Capaldi R.A., Bennett J.P. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. J. Neurosci. 2006; 26: 5256-5264.
24. Lill C.M., Roehr J.T., McQueen M.B. et al. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: the PDGene database. PLoS Genetics 2012; 8 (3): e1002548.
25. Lim K.L., Zhang C.W. Molecular events underlying Parkinson's disease - an interwoven tapestry. Frontiers Neurol. 2013; 4: Article 33.
26. Luk K.C., Lee V.M. Modeling Lewy pathology propagation in Parkinson's disease. Parkinsonism Relat. Disord. 2014; 20 (Suppl. 1): S85-S87.
27. Meredith G.E., Sonsalla P., Chesselet M.P. Animal models of Parkinson's disease progression. Acta Neuropathol. 2008; 115: 385-398.
28. Mizuno Y., Hattori N., Kubo S. et al. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. Phil. Trans. R. Soc. B. 2008; 363: 2215-2227.
29. Moehle M.S., Webber P.J., Tse T. et al. LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses. J. Neurosci. 2012; 32: 1602-1611.
30. Moore D.J., West A.B., Dawson V.L., Dawson T.M. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. Annu. Rev. Neurosci. 2005; 28: 57-87.
31. Olanow C.W. Do prions cause Parkinson disease?: The evidence accumulates. Ann Neurol. 2014; 75: 331-333.
32. Olanow C.W., McNaught K. Parkinson's disease, proteins, and prions: milestones. Mov. Disord. 2011; 26: 1056-1071.
33. Pastor P. Genetic heterogeneity in Parkinson disease: The meaning of GWAS and replication studies. Neurology 2012; 79: 619-620.
34. Priyadarshi A., Khuder S.A., Schaub E.A., Priyadarshi S.S. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. Environ Res. 2001; 86: 122-127.
35. Recasens A., Dehay B., Bove J. et al. Lewy body extracts from Parkinson's disease brains trigger  $\alpha$ -synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. Ann. Neurol. 2014; 75: 351-362.
36. Rubinsztein D.C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. Nature 2006; 443: 780-786.
37. Saiki S., Sato S., Hattori N. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2012; 83: 430-436.
38. Savitt J.M., Dawson V.L., Dawson T.M. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine. J. Clin. Invest. 2006; 116: 1744-1754.
39. Schiesling C., Kieper N., Seidel K., Kruger R. Familial Parkinson's disease – genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2008; 34: 255-271.
40. Schulz J.B., Lindennau J., Seyfried J., Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. Eur. J. Biochem. 2000; 267: 4904-4911.
41. Simon-Sanchez J., Schulte C., Bras J.M. et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. Nat. Genet. 2009; 41: 1308-1312.
42. Singleton A.B., Farrer M.J., Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. Mov. Disord. 2013; 28: 14-23.
43. Sulzer D., Surmeier D.J. Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease. Mov. Disord. 2013; 28: 41-50.



44. Taylor C.A., Saint-Hilaire M.H., Cupples L.A. et al. Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: A New England-based case control study. *Am. J. Med. Genet.* 1999; 88: 742-749.
45. Thomas B., Beal M.F. Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2007; 16: R183-R194.
46. Tran H.T., Chung C.H., Iba M. et al.  $\alpha$ -Synuclein immunotherapy blocks uptake and templated propagation of misfolded  $\alpha$ -synuclein and neurodegeneration. *Cell Rep.* 2014; 7: 2054-2065.
47. Trancikova A., Tsika E., Moore D.J. Mitochondrial dysfunction in genetic animal models of Parkinson's disease. *Antioxid. Redox Signal.* 2012; 16: 896-919.
48. Veldman B., Wijn A., Knoers N. et al. Genetic and environmental risk factors in Parkinson's disease. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 1998; 100: 15-26.
49. Watts J.C., Giles K., Oehler A. et al. Transmission of multiple system atrophy prions to transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; 110: 19555-19560.
50. Westbrock W., Gustafson A.M., Sidransky E. Exploring the link between glucocerebrosidase mutations and parkinsonism. *Trends Mol. Med.* 2011; 17: 485-493.
51. Zheng B., Liao Z., Locascio J.J. et al. PGC-1 $\alpha$ , a potential therapeutic target for early intervention in Parkinson's disease. *Sci. Transl. Med.* 2010; 2: 52-73.

# Трансляционная и профилактическая медицина как основа для борьбы с болезнью Паркинсона

*М.В. Угрюмов*

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (Москва)*

## Введение

Десятки миллионов людей в мире и миллионы в России страдают социально значимыми хроническими нейродегенеративными заболеваниями — болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона, хореей Гентингтона и др., которые, несмотря на симптоматическое лечение, заканчиваются инвалидизацией и летальным исходом. Одним из наиболее тяжелых и широко распространенных заболеваний является болезнь Паркинсона (БП). Несмотря на то, что БП была описана как нозологическая форма почти сто лет назад, до сих пор ни одного больного в мире не было вылечено. Это объясняется тем, что вопрос об этиологии этого заболевания до сих пор остается открытым, а заболевание диагностируется только после гибели большинства дофаминергических (ДА-ергических) нейронов nigrostriatной системы мозга — ключевого звена регуляции моторного поведения.

В последние 10–20 лет были получены обширные знания о молекулярной природе этиологии и патогенеза БП, на основе чего были сформулированы новые представления о БП как о полигенном, системном хроническом заболевании, развивающимся долгое время без нарушения моторики. Эти представления позволяют на основе принципов трансляционной медицины идентифицировать новые молекулы-мишени для лекарственных веществ и таким образом усовершенствовать симптоматическую терапию, а также разработать этиологическую терапию. С позиций профилактической медицины залогом успеха в борьбе с БП является создание доклинической диагностики — задолго до появления моторных симптомов, а также разработка превентивного лечения, направленного на остановку или по крайней мере замедление гибели нейронов.

## Этиология БП

Важнейшей задачей трансляционной медицины является поиск этиологических факторов заболевания на уровне генов и изучение молекулярных механизмов патогенеза. К факторам риска возникновения БП относят генетическую предрасположенность, обусловленную мутациями генов  $\alpha$ -синуклеина, паркина, тау, убиквитин карбоксил-терминальной гидролазы и др., которые в нативном состоянии играют важную роль в нормальном функционировании нейронов [1, 14, 21]. Возникающие в результате мутации генов патологические фибриллярные белки агрегированном состоянии оказывают токсическое влияние на нейроны, причем их постепенное накопление обусловлено как усилением образования, так и нарушением инактивации с помощью системы шаперонов и убиквитин-протеасомной системы [14]. Токсическое действие агрегированных олигомеров  $\alpha$ -синуклеина, тау-белка и др. широко распространяется прионоподобным путем [1, 14]. Наряду с неспецифическими токсинами, выделен эндогенный специфический токсин ДА-ергических нейронов — N-метил(R)салсолинол, похожий по структуре на ДА. Он захватывается в нейроны с помощью мембранного транспортера ДА, вызывая оксидативный стресс [18].

## Патогенез БП

Ключевым звеном патогенеза БП, независимо от этиологии, является гибель ДА-ергических нейронов, тела которых локализованы в черной субстанции, а аксоны проецируются в стриатум. Нарушения моторной функции начинаются через 20–30 лет после начала нейродегенерации при потере 50–60% тел нейронов в черной субстанции и 60–70% аксонов и ДА в стриатуме [4]. Длительное бессимптомное течение заболевания объясняется включением компенсаторных процессов, направленных на поддержание нормальной межклеточной концентрации ДА и повышение чувствительности нейронов-мишеней к этому нейротрансмиттеру в стриатуме [6, 15, 23, 24]. Появление моторных симптомов рассматривается как показатель почти полной деградации nigrostriatной ДА-ергической системы и «истощения» компенсаторных резервов мозга, что и объясняет низкую эффективность существующей симптоматической терапии.

Важной особенностью патогенеза БП является системный характер — нейродегенеративный процесс не ограничивается nigrostriatной системой, а охватывает другие отделы мозга и периферическую нервную систему. При этом в ряде отделов нервной системы нейроны погибают намного раньше, чем в nigrostriatной системе,

что приводит к нарушению многих функций мозга и внутренних органов и сопровождается появлением немоторных симптомов на доклинической стадии БП [7, 17, 20].

### Доклиническая диагностика БП

Из современных представлений о патогенезе БП следует необходимость создания доклинической диагностики и нейропротекторной терапии, что может позволить не только лечить, но и вылечивать больных.

**Клинические исследования.** Диагностирование БП на доклинической стадии уже возможно с помощью позитронно-эмиссионной томографии и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии путем оценки функционального состояния nigrostriатных DA-ергических нейронов и содержания в мозге эндогенных нейротоксинов [10, 19]. Однако по финансовым и техническим причинам эти методы не могут быть широко использованы. Поэтому исследованию с помощью неинвазивных нейровизуализационных методов должно предшествовать создание группы риска при диспансеризации здорового населения на основе поиска маркеров системных патологических процессов, развивающихся до появления моторных симптомов.

Для включения в группу риска используются маркеры в виде нарушения немоторных функций, изменения состава ликвора и крови, а также изменения экспрессии генов и фенотипа клеток крови [14, 22]. Есть основания считать, что на доклинической стадии у больных могут иметь место минимально выраженные двигательные нарушения, депрессия, чувство тревоги, утомляемость, запоры, нарушения сна, обоняния и терморегуляции, ортостатическая гипотония и др. [9, 11, 16, 17].

Наиболее информативными являются молекулярные маркеры доклинической стадии в виде изменения содержания в ликворе и крови таких веществ как: (1) нейротоксины – N-метил(R)салсолинол и агрегированные  $\alpha$ -синуклеин, тау и др.; (2) нейротрансмиттеры и их метаболиты; (3) гормоны; (4) продукты оксидативного стресса [3, 12, 17, 18]. В качестве маркеров рассматриваются изменения экспрессии генов и фенотипа клеток крови [2], а также содержание нейротоксинов – альфа-синуклеина и др. на периферии, определяемое при биопсии кожи, слюнной железы и желудочно-кишечного тракта [17]. Важно подчеркнуть, что все маркеры доклинической стадии БП лишь относительно специфичны, поскольку могут проявляться не только при этом, но и при других психоневрологических заболеваниях. Поэтому только на основе большой совокупности маркеров, выявленных у человека, его можно включить в группу риска.

**Экспериментальные исследования.** Недостатком клинических исследований по поиску маркеров доклинической стадии БП является то, что они могут быть проведены только у больных сразу после появления первых моторных симптомов, до начала симптоматического лечения. При этом исследователи допускают *a priori*, что, по крайней мере, часть биомаркеров, выявленных на ранней клинической стадии, также характерна и для доклинической стадии. В этом контексте необходимо проведение комплементарных исследований по поиску маркеров на экспериментальных моделях доклинической БП, а также сравнительный анализ маркеров на моделях доклинической и ранней клинической стадии. Такие исследования практически отсутствуют, поскольку в подавляющем большинстве работ с помощью нейротоксинов моделируется терминальная клиническая стадия БП, а большинство генетических моделей не воспроизводит нарушений моторного поведения. Поэтому нами недавно были разработаны и охарактеризованы на мышах с помощью 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) – предшественника нейротоксина DA-ергических нейронов – модели доклинической и ранней клинической стадии БП, которые воспроизводят не только допороговую и пороговую деградацию nigrostriатной DA-ергической системы, но и деградацию других отделов центральной и периферической нервной системы [15, 24]. Так, уже в первых исследованиях показано, что на досимптомной стадии у этих животных: (1) нарушаются функции симпатической нервной системы и сердечно-сосудистой системы по типу синдрома десимптизации сердца у больных при БП; (2) меняется содержание моноаминов и метаболитов в периферической крови; (3) изменяется экспрессия фенотипа лимфоцитов и т.д. (Угрюмов и соавторы, неопубликованные данные). Кроме того, на ранней клинической стадии, но не на досимптомной стадии, у этих животных, наряду с пороговой деградацией nigrostriатной DA-ергической системы и незначительными нарушениями моторного поведения, обнаружены нарушения центральной регуляция сна и гипоталамической нейроэндокринной регуляция (Манолов и др, в печати; Угрюмов и др. в печати). Крайне важно аналогичные исследования проводить и на обезьянах, особенно с учетом того, что на них также получена модель доклинической стадии БП [5].

### Нейропротекторное лечение

Создание доклинической диагностики БП позволит использовать нейропротекторную терапию, останавливающую или по крайней мере замедляющую гибель nigrostriатных DA-ергических нейронов. При этом фармакологически могут быть купированы такие патологические процессы, как: (1) оксидативный стресс; (2) накопление, агрегация и распространение патологических белков-нейротоксинов; (3) подавление воспалительной реакции, стимулирующей нейродегенерацию; (4) усиленный апоптоз нейронов; (5) снижение уровня нейро-

трофических факторов. Гораздо более проблематичным методом лечения является трансплантация в стриатум пациентов стволовых или генно-инженерных клеток, экспрессирующих фенотип ДА-ергического нейрона либо нейротрофические факторы [22].

К доклиническим испытаниям лекарственных веществ с нейропротекторными свойствами предъявляется ряд требований: (1) использование экспериментальной модели доклинической стадии БП с прогрессирующей нейродегенерацией; (2) введение в организм лекарственных веществ после начала нейродегенерации; (3) проверка эффективности лекарственных веществ на патогенетических и этиологических моделях; (4) получение окончательных доказательства эффективности лекарственных веществ на обезьянах [8]. Однако эти требования редко выполняются ввиду их дороговизны и трудоемкости.

В процессе доклинических испытаний были получены доказательства высокой эффективности в качестве нейропротекторов нейротрофических факторов, антител против патологических белков и ряда других веществ, а также клеточных и генно-инженерных технологий. Однако клинические испытания не дали ожидаемых положительных результатов. В настоящее время это является основной проблемой, которую необходимо преодолеть на пути разработки нейропротекторной терапии [13, 22].

Таким образом, современная методология борьбы с БП направлена на создание доклинической диагностики и разработку нейропротекторной терапии, что позволит надолго продлить доклиническую стадию, т.е. период комфортной жизни больного.

#### Литература

- Ballatore C., Brunden K.R., Hurny D.M. et al. Microtubule stabilizing agents as potential treatment for Alzheimer's disease and related neurodegenerative tauopathies. *J. Med. Chem.* 2012; 55: 8979-8996.
- Barbanti P., Fabbri G., Ricci A. et al. Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 1999; 14: 764-771.
- Bellomo G., Santambrogio L., Fiacconi M. et al. Plasma profiles of adrenocorticotrophic hormone, cortisol, growth hormone and prolactin in patients with untreated Parkinson's disease. *J. Neurol.* 1991; 238: 19-22.
- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O. et al. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 1971; 20: 415-455.
- Bezard E. Neuroprotection for Parkinson's disease: clinically driven experimental design in non-human primates. In: *Parkinson's disease: molecular and therapeutic insights from model systems* (R. Nass, S. Przedborski, eds.) Amsterdam: Elsevier, 2008: 65-75.
- Bezard E., Gross C.E. Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. *Prog. Neurobiol.* 1998; 55: 93-116.
- Bezard E., Yue Z., Kirik D., Maria Grazia Spillantini M.G. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov. Disord.* 2013; 28: 61-70.
- Bezard E., Yue Z., Kirik D., Spillantini M.G. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov. Disord.* 2013; 28: 61-70.
- Braak H, de Vos R.A, Bohl J, Del Tredici K. (2006) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Aurbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci. Lett.* 2006; 396: 67-72.
- DeKosky S.T., Marek K. Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. *Science* 2003; 302: 830-834.
- Goldstein D.S., Sewell L. Olfactory dysfunction in pure autonomic failure: Implications for the pathogenesis of Lewy body diseases. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2013; 15: 516-520.
- Goldstein D.S., Holmes C., Benth O. et al. Biomarkers to detect central dopamine deficiency and distinguish Parkinson disease from multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2008; 14: 600-607.
- Jankovic J., Poewe W. Therapies in Parkinson's disease. *Curr. Opin. Neurol.* 2012; 25: 433-447.
- Kalia L.V., Suneil K., Kalia S.K. et al. -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 2013; 73: 155-169.
- Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G. et al. Tyrosine hydroxylase expression and activity in nigrostriatal dopaminergic neurons of MPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism. *J. Neurol. Sciences* 2014; 340: 198-207.
- Langston J.W. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Ann. Neurol.* 2006; 4: 591-596.
- Mahlknecht P., Poewe W. Is there a need to redefine Parkinson's disease? *J. Neural. Transm.* 2013; 120 (Suppl. 1): S9-S17.
- Naoi M., Maruyama W., Akao Y., Yi H. Dopamine-derived endogenous N-methyl-(R)-salsolinol: its role in Parkinson's disease. *Neurotoxicol. Teratol.* 2002; 24: 579-591.
- Niethammer M., Feigin A., Eidelberg D. Functional neuroimaging in Parkinson's disease. In: *Additional Perspectives on Parkinson's Disease* (S. Przedborski, ed.), 2012: 1-21.
- Sandyk R., Iacono R.P., Bamford C.R. The hypothalamus in Parkinson disease. *Ital. J. Neurol.* 1987; 8: 227-234.
- Semenova E.V., Shadrina M.I., Slominsky P.A. et al. Analysis of PARK2 gene exon rearrangements in Russian patients with sporadic Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2012; 27: 139-142.
- Smith Y., Wichmann T., Factor S.A., DeLong M.R. Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of Levodopa. *Neuropsychopharmacol. Rev.* 2012; 37: 213-246.
- Ugrumov M.V. Brain neurons partly expressing monoaminergic phenotype: distribution, development, and functional significance in norm and pathology. In: *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* (A. Lajtha, ed.). Neurotransmitter Systems (S. Vizi, ed.). 3rd ed. Heidelberg: Springer, 2008: 21-73.
- Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A. et al. Modeling of preclinical and clinical stages of Parkinson's disease in mice. *Neuroscience* 2011; 181: 175-188.



# Полноэкзомное секвенирование в изучении генетических основ болезни Паркинсона

*М.В. Шульская<sup>1</sup>, В.А. Зырин<sup>1</sup>, М.И. Шадрина<sup>1</sup>, С.Н. Пчелина<sup>2</sup>,  
С.Н. Иллариошкин<sup>3</sup>, П.А. Сломинский<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Институт молекулярной генетики (Москва);*

<sup>2</sup>*Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова (Санкт-Петербург);*

<sup>3</sup>*Научный центр неврологии РАМН (Москва)*

Болезнь Паркинсона (БП) – многофакторное нейродегенеративное заболевание с выраженным генетическим компонентом, для которого характерно существование как семейных, так и спорадических форм.

Семейная форма БП может наследоваться как по аутосомно-доминантному, так и по аутосомно-рецессивному типу. Первый связанный с семейной формой БП ген *SNCA* был выявлен в конце XX века при изучении семьи итало-американского происхождения с аутосомно-доминантной формой заболевания [1]. Этот ген кодирует белок  $\alpha$ -синуклеин, являющийся основным белковым компонентом телец Леви. Дальнейший анализ семейных форм выявил целый ряд локусов, так или иначе вовлеченных в патогенез БП. При этом только для 8 локусов точно идентифицированы гены, связанные с заболеванием, определен характер наследования и выявлены мутации, приводящие к развитию моногенных форм БП [2]. Однако описанные мутации в этих генах не могут объяснить все наблюдаемые случаи семейной БП и изучение моногенных форм БП нельзя считать законченным: возможны как идентификация генов, расположенных в ранее картированных локусах, так и выявление новых локусов БП.

Развитие новых технологий секвенирования ДНК с переходом к параллельному секвенированию (так называемому *new generation sequencing*, или *NGS*) открывает новые возможности в анализе как известных генов семейной формы заболевания с выявлением ранее не описанных патогенетически значимых мутаций, так и в поиске новых генов семейных форм БП. Впервые эти возможности *NGS* технологии были продемонстрированы в 2011 г., когда при полноэкзомном *NGS* секвенировании белок-кодирующей области генома человека в семьях с аутосомно-доминантно наследуемой БП была выявлена миссенс-мутация р.Д620N в гене *VPS35*, кодирующем одну из субъединиц ретромерного комплекса [3, 4]. Дисфункция этого белка приводит к нарушению рециклинга мембрано-связанных белков, что может приводить к развитию характерных для БП фенотипических проявлений через нарушение функционирования сигнального пути Wnt [5].

В настоящей работе технология экзомного секвенирования (как полноэкзомного *NGS* секвенирования, так и классического секвенирования отдельных экзонов известных генов семейных форм БП) была использована для молекулярно-генетического анализа ранее генетически не охарактеризованной группы пациентов с БП: выборки из 10 пациентов со спорадической формой БП с ранним началом развития заболевания (возраст клинического дебюта – до 40 лет) и выборки из 70 больных с БП с поздним началом развития заболевания (более 45 лет) и семейной кластеризацией заболевания. При постановке диагноза БП все пациенты были исследованы по международной унифицированной оценочной шкале БП (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS) и шкале Hoehn–Yahr (Hoehn and Yahr scores).

Далее на первом этапе молекулярно-генетического анализа был проведен анализ ранее описанных часто ассоциированных с развитием БП мутаций. Для этого был использован метод множественной лигазной полимеразной реакции (МЛПР), который основан на использовании термостабильной лигазы для лигирования только полностью комплементарных последовательности геномной ДНК олигонуклеотидных зондов. Если последний 3'-нуклеотид зонда оказывается не комплементарен в результате мутации геномной ДНК, лигирование не происходит. После лигирования продукты лигазной реакции амплифицируют с помощью праймеров, комплементарных последовательности, общей для всех зондов. Полученные продукты амплификации анализируют с использованием капиллярного гель-электрофореза. Таким образом, предлагаемая методика позволяет быстро типировать в одной реакции МЛПР и диагностировать основные вызывающие БП мутации в таких связанных с развитием патологического процесса генах, как гены *PINK1*, *SNCA*, *ATP13A2*, *LRRK2*, *PARK2*, *TNFRSF9*, *PARK7*, *PACRG*, *CAV2*, *UCHL1*, *GCH1*. Это дает возможность исключить из программы *NGS* пациентов с частыми патогенетически значимыми мутациями и тем самым повысить эффективность поиска новых патогенетически значимых мутаций в выборке больных.

В качестве примера такого рода анализа на рисунках 1 и 2 приведены результаты МЛПР-анализа двух пациентов – носителей мутаций в генах дардарина (*LRRK2*) и паркина. Так, на рисунке 1 приведен пример пациента с миссенс-мутацией G2019S в гене *LRRK2*: об этом говорит соответствующий этой мутации сигнал (обозначен на рисунке 1 белой стрелкой). Мутаций с изменением копийности у этого больного нет: во всех случаях отношение величины сигнала для контрольной ДНК и ДНК пациента близко к 1,0. Напротив, на рисунке 2 приведен пример пациента с гетерозиготной дупликацией экзонов 2–4 гена паркина (*PARK2*): наличие у пациента дополнительной копии этой области гена доказывается соотношением сигнала в ДНК пациента и контрольной ДНК, превышающей 1,25.

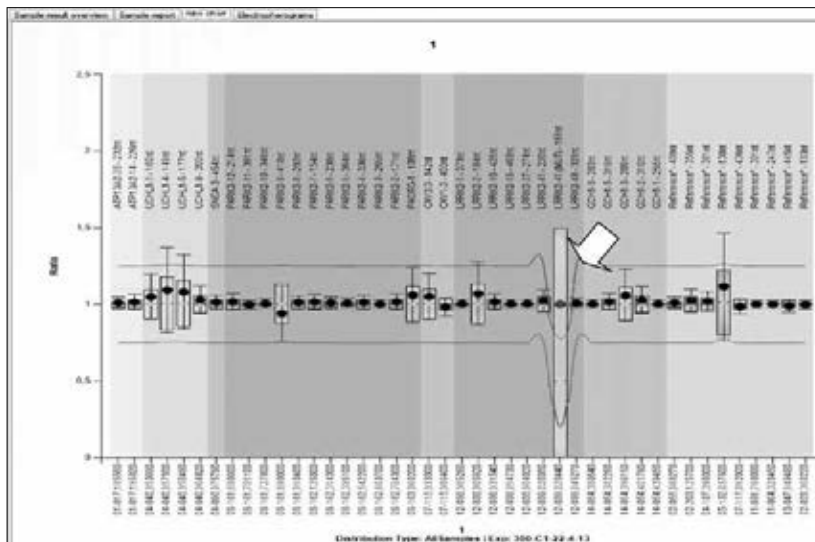


Рисунок 1. Результаты сравнительного МЛПР-анализа контрольного образца ДНК с отсутствием мутаций в изучаемых генах и образца ДНК пациента с БП и мутацией G2019S в гене *LRRK2*.

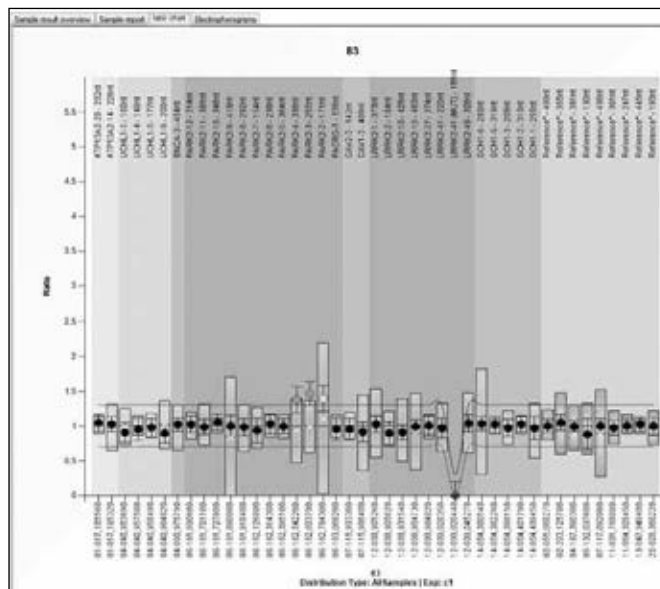


Рисунок 2. Результаты сравнительного МЛПР-анализа контрольного образца ДНК с отсутствием мутаций в изучаемых генах и образца ДНК пациента с БП и гетерозиготной дупликацией трех экзонов (2, 3 и 4) гена в паркина (*PARK2*).

В итоге различные мутации были найдены у 7 пациентов, которые были исключены из дальнейшего анализа методами NGS секвенирования. В трех случаях обнаружена миссенс-мутация G2019S в гене *LRRK2* (что подтверждает ранее полученные данные о высокой частоте этой мутации у пациентов с аутосомно-доминантной БП в различных этнических группах, и в том числе в России). У одного пациента выявлена ранее не описанная в российской популяции гетерозиготная делеция экзона 3 в гене *DJ1* в локусе *PARK7*. У трех больных вы-

явлены различные перестройки экзонов гена *PARK2*, причем обнаружены как гетерозиготные делеции экзонов этого гена (у двух пациентов), так и гетерозиготная дупликация (у одного пациента). Интересно, что во всех трех случаях перестройки захватывали экзоны 3 и 4, которые ранее нами были определены как «горячие точки» при перестройках гена *PARK2* при БП. Необходимо отметить, что эти мутации в гене *PARK2* выявлены как у пациентов со спорадической формой БП, так и у пациентов с семейной аутосомно-доминантной формой заболевания. Поэтому не исключено, что в некоторых случаях гетерозиготные делеции в гене *PARK2* могут манифестировать как доминантные мутации и приводить к поздней форме заболевания. В то же время гомозиготность по мутациям в этом гене вызывает раннюю аутосомно-рецессивную форму БП с медленным прогрессированием патологического процесса.

Для проверки этого предположения было проведено ресеквенирование всех экзонов гена *PARK2* у пациентов с гетерозиготными делециями или дупликациями одного или двух соседних экзонов гена. Подобный подход к формированию выборки для ресеквенирования связан с тем, что пациенты с такими небольшими по размеру делециями скорее всего являются истинными гетерозиготами по делеционным мутациям – тогда как длинные делеции/дупликации, наблюдаемые при МЛПР, могут быть компаундными гетерозиготами по двум разным коротким делециям. В итоге ресеквенирование было проведено у 16 пациентов – в том числе у 3 пациентов, отобранных при МЛПР-анализе в данном исследовании, и у 13 ранее описанных нами пациентов со спорадической БП и одноэкзонными делециями в гене *PARK2*. В итоге только в одном случае у пациента с гетерозиготной делецией экзона 10 была выявлена миссенс-замена Ser167Asn (g.0531638G>A). Эта мутация – хорошо известный впервые описанный в 1998 г. частый миссенс-полиморфизм, не связанный с развитием заболевания по данным мета-анализа [6, 7]. Таким образом, полученные при ресеквенировании данные подтверждают, что гетерозиготные мутации в гене паркина (*PARK2*) могут играть важную роль в патогенезе БП.

Далее у пациентов без идентифицированных частых мутаций в основных генах семейных форм БП было проведено полноэкзомное секвенирование с использованием TruSeq Exome Enrichment kit (Illumina) на секвенаторе Illumina HiSeq 2500. Всего было проведено секвенирование ДНК 48 пациентов с БП. Полученные при этом парные чтения размером 100 п.н. были картированы в геноме человека (версия референсного генома hg 19, Ch37) как описано ранее [8] при кратности чтения не менее 50 для всех картированных экзомных последовательностей. Так как в анализируемой выборке пациентов с БП предполагался аутосомно-доминантный характер наследования заболевания, для дальнейшего анализа отбирали гетерозиготные варианты, ведущие к образованию миссенс- и нонсенс-мутаций. После этого все выявленные варианты проверяли на их присутствие в базе данных dbSNP версии 137 ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_summary.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi)), в которой приведены данные о ранее выявленных однонуклеотидных полиморфных вариантах (SNV), базе данных проекта «100 геномов» (<http://www.100genomes.org>) и базе данных проекта по секвенированию экзона (ESP, <https://esp.gs.washington.edu/drupal/>). Для дальнейшего анализа отбирали варианты, которые не встречаются в этих базах данных или являются крайне редкими (частота варианта в известных базах данных не превышает 0,1%). Возможную функциональную роль новых или редких миссенс-вариантов далее анализировали с использованием пакетов программ SIFT (<http://sift.jcvi.org>), Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>), FATHMM (<http://fathmm.biocompute.org.uk>), MutationAssessor (<http://mutationassessor.org/>) и MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>). Как потенциально патогенетически значимые рассматривали варианты, для которых как минимум два метода предсказывали значительное нарушение структуры/функции белка.

Такого рода анализ был начат также с известных генов семейных форм БП: был выявлен ряд функционально важных миссенс-вариантов – как вариантов с известной патогенетической значимостью, так и новых возможно связанных с развитием патологического процесса вариантов.

Миссенс-варианты с известной функциональной значимостью были выявлены в гене *GBA*. В этом гене в нашей выборке обнаружены две миссенс-мутации – Asn370Ser и Asp140Gis, ранее описанные у пациентов с болезнью Гоше. Это подтверждает важную роль гена *GBA* в развитии аутосомно-доминантной БП. С другой стороны, выявление данных мутаций подтверждает работоспособность использованного нами подхода к поиску и идентификации потенциально функциональных вариантов в данных полноэкзомного секвенирования. Косвенным подтверждением релевантности данного подхода является и отсутствие каких-либо потенциальных патогенетически значимых вариантов в гене альфа-синуклеина у проанализированных пациентов. Хорошо известно, что миссенс-мутации в этом гене являются крайне редкими, и с учетом размера выборки пациентов выявление в ней носителей патогенетически значимых вариантов гена *SNCA* маловероятно.

У одного пациента выявлена ранее не описанная в базе данных по мутациям при БП ([http://grenada.lumc.nl/LOVD2/TPI/home.php?select\\_db=PARK2](http://grenada.lumc.nl/LOVD2/TPI/home.php?select_db=PARK2)) миссенс-мутация в гене паркина (*PARK2*) – Gln178Pro в экзоне 4. Данная мутация может быть патогенетически значима и классифицируется как “damaging” в программе SIFT и как “disease causing” в программе Mutation Tester. Это подтверждает возможную роль гетерозиготных мутаций в гене паркина в патогенезе БП.

Самое большое число потенциальных патогенетически значимых мутаций выявлено в гене *LRRK2* – что может быть связано как с высокой частотой мутаций в этом гене у пациентов с аутосомно-доминантной семейной формой БП, так и с большим размером самого гена дардарина. В таблице 1 приведен список выявленных аминокислотных замен, их локализация в экзонах гена *LRRK2* и возможный фенотипический эффект по программам SIFT и Mutation Tester.

**Таблица 1. Выявленные при полноэкзомном секвенировании ДНК пациентов с болезнью Паркинсона потенциально патогенетически значимые мутации в гене *LRRK2*.**

Мутация	SIFT	Mutation Taster
1 экзон GlyTrp	0.009 Damaging	0,98 disease causing
7 экзон CysPhe	0.002 Damaging	1 disease causing
27 экзон TrpStop	NA	1 disease causing
30 экзон ValPhe	0.007 Damaging	1 disease causing
34 экзон LysStop	NA	1 disease causing
35 экзон LeuPhe	0.023 Damaging	0,99 disease causing
45 экзон SerArg	0.024 Damaging	0,98 disease causing
45 экзон SerGly	0.035 Damaging	1 disease causing
47 экзон GluGly	0.010 Damaging	1 disease causing
47 экзон AspTyr	0.005 Damaging	1 disease causing

Таким образом, технология полноэкзомного NGS секвенирования позволяет расширить спектр мутаций в известных генах семейных форм БП. Однако наиболее интересной сферой применения NGS секвенирования является поиск новых генов семейных форм заболевания. Такой поиск может быть основан на анализе структурных вариантов кандидатных генов, отобранных на основании биоинформатических и экспериментальных данных – например, на выявлении белков, взаимодействующих с известными участвующими в патологическом процессе при БП белками.

Одним из таких белков является белок PARIS, кодируемый геном *ZNF746* [9]. Этот белок участвует в контроле за биогенезом митохондрий и его активность контролируется паркином – при блокировании паркином белка PARIS биогенез этих органелл *de novo* возрастает. При недостаточности паркина уровень биогенеза митохондрий резко падает за счет повышения активности белка PARIS, а уровень митофагии дефектных митохондрий (частично также по причине снижения активности паркина) падает. В итоге повышается чувствительность клеток к оксидантному стрессу, что и приводит к их гибели. В связи с этим нами был проведен поиск потенциальных патогенетически значимых вариантов в гене *ZNF746* и было выявлено два таких варианта в экзоне 7 – Cys270Arg и His281Pro.

Обе аминокислотные замены приводят к выраженным изменениям в структуре белка и затрагивают высококонсервативные аминокислотные остатки, что подтверждается данными анализа структуры мутантных белков в программах Mutation tester (согласно которой обе мутации являются “disease causing”), SIFT (согласно которой обе мутации являются “damaging”). Конечно, полученные данные не позволяют однозначно утверждать, что ген *ZNF746* является геном семейной формы заболевания, но резко повышают интерес к дальнейшему изучению этого гена и анализу его возможной роли в патогенезе БП.

#### Литература

1. Polymeropoulos M.H., Higgins J.J., Golbe L.I. et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996; 274: 1197-1199.
2. Lesage S., Brice A. Role of “Mendelian” genes in “sporadic” Parkinson's disease *Parkinsonism Relat. Disord.* 2012; 83: 129-151.
3. Vilarino-Guell C., Wider C., Ross O.A. et al. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2011; 89: 162-167.
4. Zimprich A., Benet-Pages A., Struhal W. et al. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late onset Parkinson disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2011; 89: 168-175.
5. Deng H., Gao K., Jankovic J. The VPS35 gene and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2013; 5: 569-575.
6. Hattori N., Kitada T., Matsumine H. et al. Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals. *Ann Neurol.* 1998; 44: 935-941.
7. Zhang Y., Wang Z.Z., Sun H.M. Lack of association between p.Ser167Asn variant of Parkin and Parkinson's disease: a meta-analysis of 15 studies involving 2,280 cases and 2,459 controls. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr Genet.* 2012; 159B(1): 38-47.
8. Nikopensius T., Saag M., Jagomägi T. et al. A missense mutation in DUSP6 is associated with Class III malocclusion. *J. Dent. Res.* 2013; 92: 893-898.
9. Shin J.H., K, H.S., Kang H. et al. PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell* 2011; 144: 689-702.



# Агрегация альфа-синуклеина как возможный молекулярный механизм связи болезни Паркинсона и лизосомных болезней накопления

*С.Н. Пчелина<sup>1,2</sup>, А.К. Емельянов<sup>1,2</sup>, Е.П. Нужный<sup>1</sup>, Т.С. Усенко<sup>1,2</sup>, А.Ф. Якимовский<sup>1</sup>,  
Е.Ю. Захарова<sup>3</sup>*

*<sup>1</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова; <sup>2</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова (Санкт-Петербург); <sup>3</sup>Медико-генетический научный центр РАМН (Москва)*

В последнее время накапливается все больше фактов, свидетельствующих об общности молекулярных механизмов нейродегенеративных заболеваний, ассоциированных с агрегацией пресинаптического белка альфа-синуклеина, в первую очередь болезни Паркинсона (БП), и редких наследственных заболеваний из класса лизосомных болезней накопления (ЛБН), связанных с дисфункцией лизосом. В настоящей работе приводится обзор данных о вкладе в риск развития БП мутаций в генах ЛБН, в частности, гена глюкоцереброзидазы (GBA). Обсуждается возможный механизм формирования высокого риска развития БП у носителей данных мутаций. Приводятся собственные данные, впервые свидетельствующие о повышении олигомерных форм альфа-синуклеина в крови у пациентов с различными ЛБН. Существующие данные позволяют высказать предположение, что лекарственная терапия для ЛБН, в частности болезни Гоше, может иметь нейропротекторный эффект при БП.

## 1. Роль альфа-синуклеина в патогенезе болезни Паркинсона.

В настоящее время в качестве основного звена патогенеза БП рассматривается формирование нейротоксических агрегатов небольшого пресинаптического белка альфа-синуклеина (Coockson, 2008). 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 представляет собой небольшой нейрональный белок, обнаруживаемый, в основном, в пресинаптических терминалах, представленный в клетке в качестве физиологически активной формы - в виде тетрамера (Bartel, 2011). В настоящее время описан ряд гипотетических основных функций альфа-синуклеина, указывающих на его вовлеченность в процессы везикулярного транспорта и регуляцию работы дофаминового транспортера, что позволяет контролировать уровень входящего и выходящего в клетку дофамина (Lee, 2001); предполагается также регуляция активности фермента тирозингидроксилазы, катализирующего в клетке синтез дофамина (Perez, 2002). Однако точные физиологические функции этого белка остаются неизвестными.

Исследование роли альфа-синуклеина в патогенезе БП началось с открытия в 1997 мутаций в гене SNCA, приводящих к развитию аутосомно-доминантных форм заболевания. К настоящему моменту описаны всего описаны четыре точковые мутации в функционально значимом домене данного гена: A30P – в немецкой семье (Kruger, 1998), E46K – в семье баско-испанского происхождения. (Zarranz, 2004), H50Q – у пациента из Великобритании с отсутствием заболевания среди родственников (Proukakis, 2013) и G51D – при семейной форме паркинсонизма с развитием пирамидной симптоматики у пациента из Франции (Lesage, 2013) (рис. 1).

В настоящее время описано не более 15 семей с БП, ассоциированной с точечными мутациями гена SNCA. Более распространенными среди пациентов с наследственной формой БП являются мультипликации гена SNCA (дубликации и трипликации), приводящих к развитию аутосомно-доминантной формы заболевания (Singleton, 2003). Следует отметить, что мультипликации нормальной последовательности гена SNCA, приводящей к увеличению внутриклеточного уровня альфа-синуклеина, достаточно для развития БП. Было показано, что возраст начала и тяжесть заболевания коррелируют с количеством копий гена (Singleton, 2003, Ibañez, 2009). Убедительным доказательством нейротоксичности альфа-синуклеина стало создание трансгенных животных (дрозофила, мышь) на основе гиперэкспрессии гена SNCA человека, демонстрирующих нейрональные синуклеин-позитивные включения и возрастную дегенерацию дофаминергических нейронов мозга (Feaneay, Bender 2000; Masliah 2000). Нейротоксичность агрегатов альфа-синуклеина была многократно продемонстрирована *in vitro* (Bisaglia, 2010; Waxman, Giasson 2010). Также немаловажным аспектом в исследовании роли альфа-синуклеина в патогенезе БП

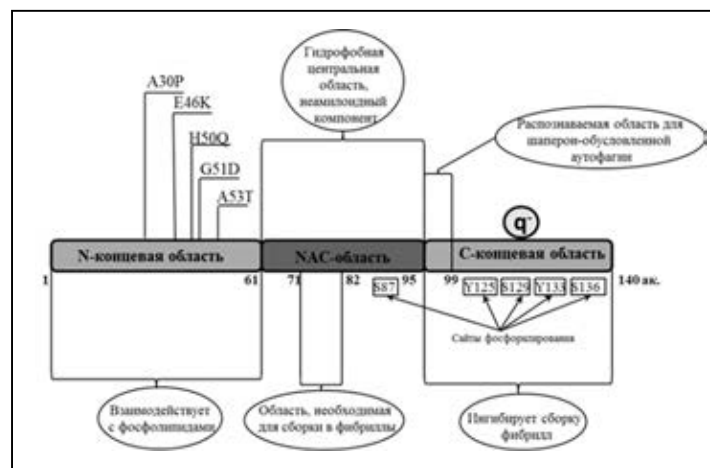


Рис. 1. Структура альфа-синуклеина. Указаны точковые мутации, приводящие к наследственным формам БП. Обозначены функциональные домены белка и сайты фосфорилирования.

является обнаружение в цитоплазме нейронов телец Леви, в которых около 60% от общего белка приходится на долю агрегатов альфа-синуклеина.

Формирование фибрилл альфа-синуклеина *in vitro*, подобных фибриллам в составе телец Леви, а также тот факт, что мутация A53T ускоряет образование фибрилл, свидетельствуют о том, что олигомеризация альфа-синуклеина может быть непосредственно связана с патогенезом БП. Несмотря на множество данных, указывающих на патогенную роль фибриллярного альфа-синуклеина в клетке, механизмы токсичности фибрилл остаются неизвестными. В настоящее время доминирует гипотеза о том, что токсичны не сами фибриллы альфа-синуклеина, а протофибриллы, характеризующиеся содержанием, помимо олигомерной формы, также фибрилл альфа-синуклеина, имеющих  $\beta$ -складчатую структуру. Имеется предположение, что протофибриллы могут формировать поры, способные к встраиванию в мембрану и изменяющие её проницаемость и, как следствие, клеточный гомеостаз. Последние данные указывают на прионоподобные свойства альфа-синуклеина (Luketal., 2009). Показана способность альфа-синуклеина и его агрегатов к секреции с последующим захватом соседними клетками. Предполагается, что экзогенный фибриллярный альфа-синуклеин может в дальнейшем служить центром агрегации растворимого мономерного белка (Waxman, Giasson 2010). В сумме приведенные данные подтверждают гипотезу о нейротоксичности фибриллярных форм альфа-синуклеина и их роли в патогенезе БП, однако точный механизм нейродегенерации остается неизвестным.

Интересно, что посттрансляционные модификации альфа-синуклеина (окисление, фосфорилирование, нитрозилирование) также влияют на его способность к агрегации. Фосфорилирование - наиболее общий механизм для регуляции активности и функции белков. Ранее была показана связь фосфорилирования цитоскелетного белка тау и болезни Альцгеймера. У пациентов с БП, как и при деменции с тельцами Леви (ДТЛ), альфа-синуклеин в тельцах Леви обнаруживается в основном в фосфорилированной в положении S129 форме (Fujiwara, 2002; Anderson, 2006). В составе телец Леви обнаруживаются также фосфорилированные по Ser87 формы белка (Paleologou, 2010). *In vitro* установлено, что C-концевая часть альфа-синуклеина содержит несколько сайтов фосфорилирования (S87, T125, T133, T136) (Ellis, 2001). Несмотря на обилие информации о фосфорилированных формах альфа-синуклеина, вопрос о нейротоксичности фосфорилированных форм альфа-синуклеина остаётся открытым. Другими возможными механизмами усиления нейротоксичности альфа-синуклеина являются окисление и нитрозилирование данного белка. Считается, что окисление альфа-синуклеина приводит к олигомеризации белка и последующей его агрегации, благодаря образованию о,о'-дитиозиновых олигомеров. В случае нитрозилирования при наличии активных форм кислорода оксид азота формирует пероксинитрит, обеспечивающий превращение остатков тирозина в тех же положениях, что и при окислении, в 3-нитротирозин (Ischiropoulos, 2003), что способствует стабилизации олигомеров альфа-синуклеина (Norris, 2003).

## 2. Мутации в генах ЛБН как фактор риска развития синуклеинопатий.

Впервые данные о связи ЛБН с БП были получены при исследовании пациентов с болезнью Гоше (БГ). БГ — ауtosомно-рецессивное заболевание из группы гликофинголипидозов, в основе которого лежат мутации в гене глюкоцереброзидазы (GBA), приводящие к снижению активности данного фермента и накоплению в лизосомах липида глюкоцереброзида.

Предположение о связи мутаций в гене *GBA* с БП было сделано в 1994 году на основании обнаружения у некоторых пациентов с БГ симптомов паркинсонизма (Neudorfer, 1996). При обследовании многочисленных групп пациентов с БГ было выявлено, что у некоторых больных развивается синдром паркинсонизма, а родственники первой степени родства чаще заболевают БП (Tayebi, 2003). В дальнейшем проводились молекулярно-генетические исследования гена *GBA* в различных популяциях у пациентов с БП, деменцией с тельцами Леви (ДТЛ) и в контроле, которые выявили повышенную частоту гетерозиготного носительства мутаций в группах больных (Lwin, 2004; Ziegler, 2007, Emelyanov, 2012). Крупное мультицентровое исследование, включившее более 5000 пациентов с БП и соответствующее число индивидуумов контрольной группы, предполагает, что гетерозиготное носительство мутаций в гене *GBA* повышает риск развития БП в 5,43 раз (Sidransky, 2009). В другом исследовании, в которое вошли 151 пациент с БП и деменцией, было выявлено, что риск развития БП с деменцией при носительстве мутаций повышен в 6,48 раз (Nalls, 2013). Интересно отметить, что только четверть пациентов с БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA*, сообщают о положительном семейном анамнезе. Фенотипически БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA*, не отличается от идиопатической БП, хотя в ряде исследований отмечается более раннее начало заболевания в среднем на 1,8-6,0 лет. Также имеются сообщения о более частом развитии у таких пациентов когнитивного дефицита (Sidransky, 2009; Nichols, 2009). Исследование, включившее 721 пациента с ДТЛ, показало, что гетерозиготное носительство мутаций в гене *GBA* повышает риск развития ДТЛ в 8,28 раз, при этом носительство мутации приводит к более раннему началу заболевания по сравнению с пациентами без мутаций (Nalls, 2013).

В 2011 году появились данные, что гомозиготы по аллелю С полиморфизма rs2071046 гена *NAGLU* имеют повышенный риск развития БП в 1,32 раз (Winder-Rhodes et al., 2011). Данный ген кодирует лизосомный фермент N-ацетилглюкозаминидазу, а гомозиготное носительство мутаций в гене *NAGLU* приводит к развитию ЛБН – мукополисахаридоза IIIВ (синдром Санфилиппо) с накоплением гепарансульфата в лизосомах.

В 2013 году два независимых исследования выявили, что мутации в гене *SMPD1*, кодирующем лизосомный фермент сфингомиелиназу, являются факторами риска развития БП. Gan-Or с соавторами показали, что мутация p.L302P повышает риск развития БП в 9,4 раза среди евреев Ашкенази. В другом исследовании, включающем 1004 пациентов с БП китайского происхождения, в качестве фактора риска была описана мутация p.R591C. В гомозиготном состоянии мутации в гене *SMPD1* приводят к развитию сфинголипидоза – болезни Ниманна-Пика типов А и В. Интересно отметить, что Gan-Or с соавт., помимо исследования гена *SMPD1*, осуществил поиск мутаций в генах *HEXA* и *MCOLN1* среди пациентов с БП (эти гены приводят к развитию болезни Тея-Сакса и муколипидоза IV типа, соответственно), однако разница между частотой мутаций в группах пациентов и контроля не была обнаружена. Также имеются сообщения о развитии паркинсонизма среди гетерозиготных носителей мутаций в гене *NPC1*, которые в гомозиготном состоянии приводят к возникновению болезни Ниманна-Пика тип С (Kluenemann, 2013).

Не было обнаружено разницы между частотой полиморфизмов в промоторе и экзонах гена *GLA*, кодирующим лизосомный фермент альфа-галактозидазу А, среди пациентов со спорадической формой БП и контролем (Wu, 2011). Ген *GLA* расположен в X-хромосоме, его мутации приводят к развитию болезни Фабри, характеризующейся накоплением в лизосомах глоботриаозилцерамида.

Необходимо отметить, что имеются многочисленные сообщения о развитии паркинсонизма среди пациентов с ЛБН и возникновение БП среди носителей мутаций в генах, приводящих к ЛБН (Shachar, 2011). Например, паркинсонизм может развиваться у пациентов с болезнью Тея-Сакса, болезнью Фабри, нейрональными цероидными липофузинозами 1, 2, 3, 10 типов. Данный факт может свидетельствовать о том, что существуют и другие гены ЛБН, кроме *GBA* и *SMPD1*, повышающие риск развития БП.

Нами впервые описан пациент с гетерозиготным носительством делеции 1,02kb в гене *CLN3* (кодирует лизосомный транспортный белок, в гомозиготном состоянии мутации приводят к развитию заболевания из класса ЛБН – нейронального липофузиноза или болезни Баттена), долгое время наблюдавшийся с диагнозом БП из-за наличия тремора покоя и постуральных расстройств, однако со временем диагноз был изменен на «нейродегенеративное заболевание с симптомами поражения экстрапирамидной системы».

### 3. Накопление альфа-синуклеина при ЛБН.

В настоящее время появилось ряд работ, демонстрирующих накопление агрегированных форм альфа-синуклеина в мозге пациентов с различными ЛБН (таблица 1).

Впервые тельца Леви, дающие положительную реакцию на альфа-синуклеин при иммуногистохимии, в мозгу четырех пациентов с болезнью Гоше и паркинсонизмом были описаны в 2004 году в работах Wongi Lwin (Lwin, 2004). В дальнейшем было обнаружено наличие телец Леви и агрегатов альфа-синуклеина при различных ЛБН. Так при патоморфологическом исследовании мозга пациентов с некоторыми ЛБН (GM2-ганглиозидоз, болезнь Санфилиппо, болезнь Фабри) обнаружены патологические изменения черной субстанции (таблица 1). В отличие

Таблица 1. Агрегация альфа-синуклеина, наблюдаемая при различных ЛБН.

ЛБН	Мутантный ген	Дефектный белок	Проявления нарушения метаболизма альфа-синуклеина	Источник
Болезнь Гоше	<i>GBA</i>	Глюкоцереброзидаза	Наличие альфа-синуклеин- и глюкоцереброзидаза-позитивных телец Леви в нейронах головного мозга у пациентов с паркинсонизмом	Wong et al., 2004; Lwin et al., 2004
Болезнь Краббе	<i>GALC</i>	Галактоцереброзидаза	Высокомолекулярные агрегаты альфа-синуклеина в нейронах головного мозга	Smith et al., 2014
GM2-ганглиозидоз (болезнь Тея-Сакса, Сандхоффа)	<i>HEXA</i> и <i>HEXB</i>	Гексозаминидаза А и В	Агрегация альфа-синуклеина в нейронах большого мозга, ствола и мозжечка	Suzuki et al., 2007
Болезнь Ниманна-Пика тип С	<i>NPC1</i> и <i>NPC2</i>	Лизосомные переносчики холестерина NPC1 и NPC2	Агрегация альфа-синуклеина в нейронах среднего мозга и амигдалы; тельца Леви в нейронах черной субстанции	Saito et al., 2004
Мукополисахаридоз II типа (Хантера)	<i>IDS</i>	Идуронат-2-сульфатаза	Агрегация фосфорилированного альфа-синуклеина в нейронах головного мозга	Hamano et al., 2008
Мукополисахаридоз IIIA типа (Санфилиппо)	<i>SGSH</i>	Гепарансульфатаза	Агрегация альфа-синуклеина вокруг ядер кортикальных нейронов	Winder-Rhodes et al., 2011
Метахроматическая лейкоцисторфия	<i>ARSA</i>	Арилсульфатаза А	Агрегация альфа-синуклеина в аксонах и глие белого вещества, в нейронах ствола мозга	Suzuki et al., 2007
Болезнь Баттена (нейрональный цероидный липофусциноз 3 типа)	<i>CLN3</i>	Лизосомный транспортный белок CLN3	Повышение олигомеров альфа-синуклеина в культуре лимфоцитов от пациентов	Kang et al., 2014

от БП, при которой тельца Леви образуются преимущественно в нейронах черной субстанции, при ЛБН агрегация альфа-синуклеина с формированием телец Леви происходит практически во всех отделах головного мозга. Это может объяснять более выраженную неврологическую симптоматику, характерную для большинства ЛБН.

#### 4. Возможные механизмы агрегации альфа-синуклеина при мутациях в гене *GBA*.

Мутации в гене *GBA*, приводящие к потере функциональной активности глюкоцереброзидазы, приводят к развитию наиболее распространенной из ЛБН – болезни Гоше (БГ). Выделяют три типа БГ. Наиболее распространенная форма заболевания (1 случай на 40000–60000 общей популяции) – БГ 1-го типа (без нейронопатии). У некоторых пациентов протекает бессимптомно, у других возможно развитие серьезной и даже жизнеугрожающей симптоматики, мозг и нервная система не поражаются. При 2-м и 3-м типах БГ происходит поражение нервной системы. Смерть наступает в детском возрасте. Ген *GBA* кодирует фермент глюкоцереброзидазу, катализирующую расщепление глюкоцереброзида до глюкозы и церамида внутри лизосом. Мутации в гене *GBA* приводят к накоплению нерасщепленного субстрата у пациентов с БГ (Sidransky, Lopez, 2012). В плазме крови пациентов наблюдается также повышение других метаболитов, в частности хитотриозидазы, и глюкозилсфингозина, деацетилизованной формы глюкоцереброзида (Dekker, 2011). Диагностика заболевания проводится на основании оценки активности глюкоцереброзидазы в лимфоцитах крови и подтверждается выявлением мутаций в гене *GBA*.

Сегодня разработаны два подхода для терапии БГ – субстрат-редуцирующая терапия и фермент-заместительная терапия (ФЗТ). Большинство пациентов с БГ первого типа получают ФЗТ, которая считается более эффективной. При ФЗТ пациенты получают внутривенную инъекцию рекомбинантной глюкоцереброзидазы каждые две недели, что приводит к существенному снижению симптомов заболевания.

Как отмечалось выше, мутации в гене *GBA* повышают риск развития БП в 6-8 раз во всех популяциях. На сегодня этот фактор риска выявляется у пациентов с БГ чаще всего (Sidransky, Lopez, 2012). Чем же может объясняться высокий риск развития БП у гетерозиготных носителей в гене *GBA*? Поскольку гибель нейронов мозга при БП связывают с агрегацией белка альфа-синуклеина (Cookson, Bandmann, 2010), логично предположить, что мутации в гене *GBA* влияют на формирование нейротоксических олигомерных форм этого белка. Необходимо отметить, что альфа-синуклеин деградирует в клетке двумя путями: около половины связывается с убиквитином и далее гидролизует в протеасомах, другая половина альфа-синуклеина подвергается шаперон-зависимой ауто-



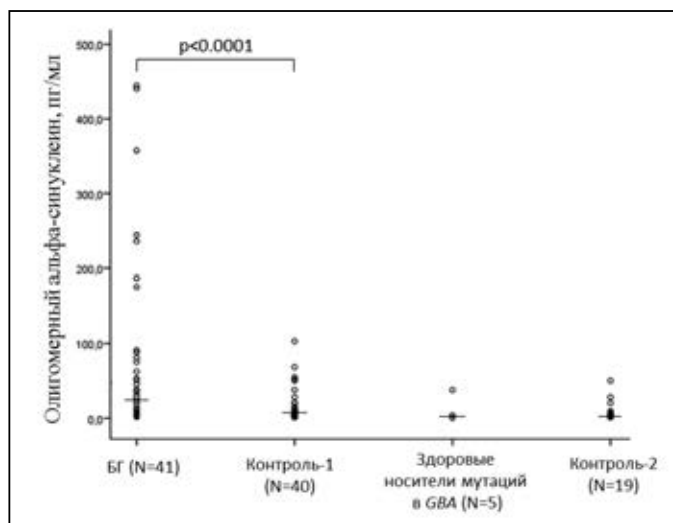


Рис. 2. Уровень олигомерного альфа-синуклеина у пациентов с БГ, здоровых носителей мутаций в гене *GBA* и в соответствующих по возрасту и полу контрольных группах.

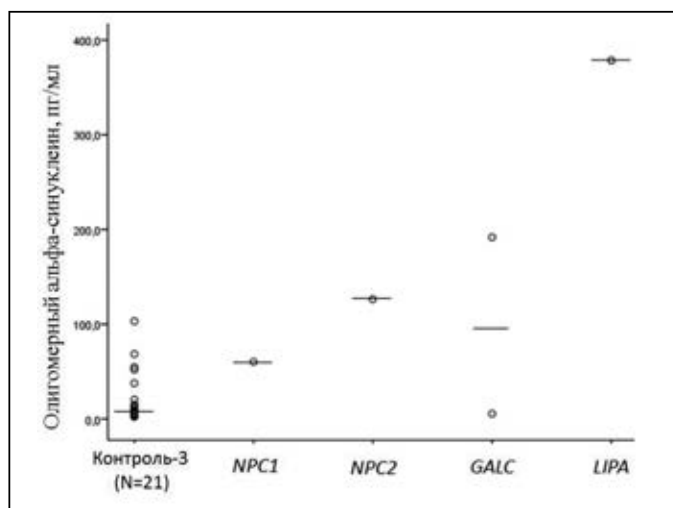


Рис. 3. Уровень олигомерного альфа-синуклеина у пациентов с болезнью Ниманна-Пика тип С (мутации в генах *NPC1* и *NPC2*), болезнью Краббе (мутации в гене *GALC*), болезнью Вольмана (мутации в гене *LIPA*) и в контрольной группе.

фагии, т.е. селективно транслоцируется в лизосомы для последующей деградации (Cuervo, 2004). Таким образом, дисфункция лизосом, наблюдаемая при ЛБН, может приводить к накоплению альфа-синуклеина в цитозоле, способствуя его олигомеризации и клеточной токсичности.

Мы предположили, что у пациентов с БГ, а также с другими ЛБН, может наблюдаться увеличение уровня олигомерного альфа-синуклеина в клетках и внеклеточных жидкостях и провели оценку олигомерных форм альфа-синуклеина в плазме крови у 41 пациента с БГ и у 40 пациентов контрольной группы. Также в исследование вошло 5 пациентов с другими ЛБН (2 пациента с болезнью Ниманна-Пика тип С, 2 – с болезнью Краббе, 1 – с болезнью Вольмана). Было обнаружено достоверное повышение уровня олигомерного альфа-синуклеина как у пациентов с БГ ( $p=0,0001$ ), так и у большинства из пациентов с другими ЛБН (рис.2, 3). Интересно отметить, что у гетерозиготных носителей мутаций в гене *GBA* (родители пациентов с БГ) уровень олигомеров альфа-синуклеина не отличался от контроля (рис.2).

Девять пациентов с БГ были обследованы нами до назначения ФЗТ. Тридцать два пациента принимали ФЗТ в течении различного периода (от 0,5 до 14 лет) в виде внутривенных инъекций препарата церезим. Наиболее высокий уровень альфа-синуклеина наблюдали у пациентов с БГ, не получавших лечения, в то время как уровень альфа-синуклеина плазмы у пациентов, получавших лечение ФЗТ более пяти лет, не отличался от контроля (та-

Таблица 2. Уровень олигомерного альфа-синуклеина плазмы крови в зависимости от длительности ФТЗ.

Группы	Медиана (min – max), пг/мл	p
Пациенты с БГ, не получающие ФТЗ (N=9)	37,62 (6,45 – 440,42)	0,001
Пациенты с БГ, получающие ФТЗ менее 5 лет (N=17)	29,27 (4,61 – 357,34)	0,001
Пациенты с БГ, получающие ФТЗ 5 лет и более (N=15)	12,38 (1,57 – 444,58)	>0,05
Контроль (N=40)	6,02 (2,29 – 103,14)	

блица 2). Недавно было показано, что экзогенная экспрессия гена *GBA*, повышающая уровень этого фермента, способствовала устранению симптомов паркинсонизма на мышинных моделях болезни Гоше (Sardi, 2013). Можно предположить, что усиление активности *GBA* или снижение уровня субстрата данного фермента может рассматриваться как потенциальная стратегия лечения синуклеопатий, ассоциированных с мутациями в гене *GBA*.

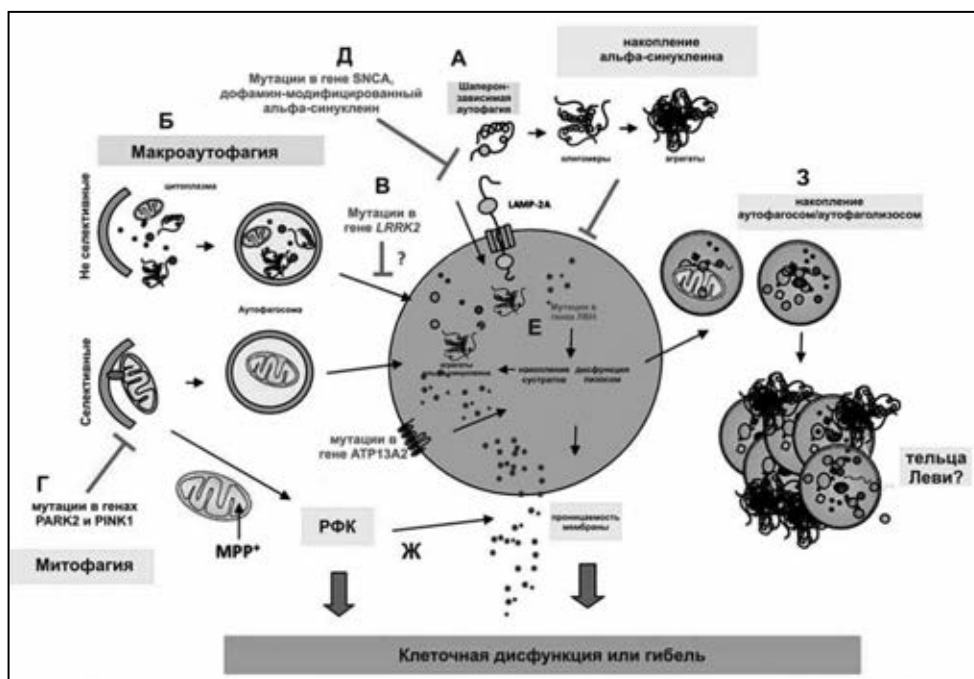
Проведенное нами исследование показало увеличение концентрации олигомеров альфа-синуклеина пациентов с БГ по сравнению с контролем. Недавно в одном исследовании было продемонстрировано увеличение димеров данного белка в эритроцитах пациентов с БГ (Argyriou, 2012). В сумме полученные данные предполагают, что недостаточность глюкоцереброзидазы дисфункция лизосом, наблюдаемая при БГ, может приводить к увеличению уровня олигомерных форм альфа-синуклеина в крови. Наши результаты подтверждают результаты, полученные ранее на животных моделях, клеточных культурах и на нейрональных культурах из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) от пациентов с БГ (Mazzulli, 2011; Ginns, 2014).

Необходимо, однако, отметить, что повышение уровня олигомеров альфа-синуклеина, наблюдаемое нами и другими исследователями у пациентов с БГ, не может в полной мере объяснить высокий риск развития БП у носителей мутаций в гене *GBA* в гетерозиготном состоянии. Гетерозиготное носительство мутаций не приводит к значимому снижению активности глюкоцереброзидазы. Тем не менее нами выявлен исключительно высокий уровень олигомеров альфа-синуклеина у двух пациентов с БП, имеющих мутации в генах ЛБН (носитель мутации L444P *GBA* и del*CNL3*). Оба пациента не получали лечения. Резкое повышение уровня олигомерного альфа-синуклеина в ЦНС у пациентов с БП – гетерозиготных носителей мутации (N370S) в гене *GBA* отмечалось и ранее (Parnetti, 2013). В настоящем исследовании нами впервые исследован уровень олигомерного альфа-синуклеина у гетерозиготных носителей мутаций в гене *GBA* с отсутствием неврологических заболеваний. Показано, что по сравнению с лицами с отсутствием мутаций в гене *GBA* уровень олигомерного альфа-синуклеина в плазме крови не изменен.

При объяснении механизма увеличения уровня альфа-синуклеина при наличии мутаций в гене *GBA* рассматриваются несколько возможностей. Во-первых, высказывается предположение, что мутации в гене *GBA* могут приводить к увеличению уровня олигомерного альфа-синуклеина через приобретение новой функции (gain-of-function) (McGlinchey, Lee, 2013). В одном исследовании было продемонстрировано прямое взаимодействие альфа-синуклеина и глюкоцереброзидазы при pH 5,5 (Yap, 2011). Мутация в гене *GBA*, приводящая к аминокислотной замене N370S, имеет сниженную афинность к альфа-синуклеину, ослабляя их взаимодействие, что может приводить к накоплению альфа-синуклеина. Полученные нами данные о повышении олигомерного альфа-синуклеина плазмы крови при других ЛБН указывают, однако, на то, что влияние на олигомеризацию альфа-синуклеина не ограничивается дисфункцией глюкоцереброзидазы при БГ, а видимо носит более широкий характер.

Предложенные модели «loss-of-function» рассматривают накопление альфа-синуклеина вследствие дисфункции лизосом, так как около половины клеточного альфа-синуклеина деградирует из клетки путем шаперон-зависимой аутофагии (Mazzulli, 2011). Еще одно предположение, представляющееся на наш взгляд наиболее вероятным – это участие в стабилизации нейротоксичных форм альфа-синуклеина накапливающихся субстратов, в частности глюкозилцерамида, субстрата *GBA*. В недавно опубликованном исследовании Schondorf с соавторами (Schondorf et al., 2014), выполненном на дофаминсинтезирующих нейронах, полученных с помощью iPSC-технологии от пациентов с БП с гетерозиготным носительством мутаций *GBA*, показано накопление глюкозилцерамида. Интересно, что другой субстрат, психозин, аккумулирующийся при болезни Краббе (из группы ЛБН), также способен ускорять формирование олигомерных форм альфа-синуклеина (Sidransky, Lopez, 2012). Важно отметить, что нарушение метаболизма сфинголипидов было также отмечено у пациентов с БП, не являющихся носителями мутаций в гене *GBA*.

В заключение хочется отметить, что полученные данные в сумме позволяют предположить, что мутации в генах ЛБН, в частности в генах *GBA* (болезнь Гоше) и *SMPD1* (болезнь Нимана-Пика тип А и В) существенно по-



**Рис. 4.** Возможные молекулярные механизмы, приводящие к аккумуляции альфа-синуклеина при болезни Паркинсона вследствие дисфункции лизосом. Альфа-синуклеин деградирует в клетке различными путями включая убиквитин-протеосомную систему и аутофагию. В лизосомах может происходить деградация различных видов альфа-синуклеина различными путями, включая макроаутофагию, шаперон-зависимую аутофагию, эндоцитоз.

(А) Растворимый мономерный альфа-синуклеин преимущественно деградирует через лизосомы путем шаперон-зависимой аутофагии, в то время как (Б) путем макроаутофагии могут быть деградированы как растворимые так и олигомерные формы. (В) Мутации в гене *LRRK2*, приводящие к развитию наследственных форм БП, ассоциированы с нарушением процесса аутофагии. (Г) Мутации в генах *PARK2* и *PINK1*, ассоциированных с развитием рецессивных форм БП, приводят к нарушению митофагии. (Д) Показано, что мутации в генах *SNCA* (*A30P*, *A53T*), приводящие к развитию доминантных форм БП, а также окисленные формы альфа-синуклеина блокируют шаперон-зависимую аутофагию путем усиления связывания с рецептором *LAMP-2A* на мембране лизосом. (Е) Мутации в генах *ЛБН* (*GBA*, *SMPD1*) приводят к нарушению работы лизосом, нарушают метаболизм сфинголипидов и являются фактором риска развития БП. Накапливающиеся при этом субстраты могут стабилизировать формирование олигомерных форм альфа-синуклеина. (Ж) Реактивные формы кислорода (РФК), образующиеся вследствие воздействия МФТП или олигомеров альфа-синуклеина, могут усилить проницаемость мембраны лизосом и способствуют нарушению ее целостности. (З) В результате дисфункции лизосом приводит к накоплению токсичных (агрегированных) форм альфа-синуклеина, что может приводить к образованию крупных агрегатов альфа-синуклеина (тельца Леви) и/или гибели клетки (Dehay, 2013, с модификациями).

вышают риск развития БП (от 6 до 9 раз) путем влияния на метаболизм белка альфа-синуклеина, агрегация которого рассматривается в настоящее время как основной механизм нейродегенерации. Следует также отметить, что обсуждаются и другие причины накопления альфа-синуклеина в клетке вследствие дисфункции лизосом (рис. 4). Выявленное нами повышение олигомерных форм альфа-синуклеина у пациентов с различными ЛБН (болезнью Гоше, болезнью Вольмана, болезнью Краббе) подтверждает данную гипотезу. Высказывается также предположение о том, что субстрат-редуцирующая терапия для болезни Гоше может способствовать снижению темпов формирования олигомерных структур альфа-синуклеина, проявляя тем самым нейропротекторные свойства.

#### Литература

1. Anderson J., Walker D.E., Goldstein J.M. et al. Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol. Chem.* 2006; 281:9739-29752.
2. Argyriou A., Dermentzaki G., Papisilekas T. et al. Increased dimerization of alpha-synuclein in erythrocytes in Gaucher disease and aging. *Neurosci.Lett.* 2012; 528:205-209.
3. Bartels T., Choi J.G., Selkoe D.J.  $\alpha$ -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 2011; 477(7362):107-110.
4. Bisaglia M., Greggio E., Dragan M. et al.  $\alpha$ -Synuclein overexpression increases dopamine toxicity in BE(2)-M17. *Cells BMC Neuroscience* 2010; 11:41.
5. Cookson M.R., Bandmann O. Parkinson's disease: insight from pathways. *Human Molecular Genetics* 2010; 19:21-27.
6. Cuervo A.M., Stefanis L., Fredenburg R., Lansbury P.T., Sulzer D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004; 305:1292-1295.
7. Dehay B., Martinez-Vicente M., Caldwell G.A. et al. Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov.Disord.* 2013; 28:725-732.
8. Dekker N., Dussen van L., Hollak C.E. et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood* 2011; 118:118-127.
9. Ellis C.E., Schwartzberg P.L., Grider T.L., Fink D.W., Nussbaum R.L. Alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:3879-3884.
10. Emelyanov A., Boukina T., Yakimovskii A. et al. Glucocerebrosidase gene mutations are associated with Parkinson's disease in Russia. *Mov.Disord.* 2012; 27:158-159.
11. Feany M.B., Bender W.W. A drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 2000; 404:394-398.
12. Foo J.N., Liany H., Bei J.X. et al. A rare lysosomal enzyme gene *SMPD1* variant (p.R591C) associates with Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 2013; 34:13-15.

13. Fujiwara H., Hasegawa M., Dohmae N. et al. Alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol.* 2002; 4:160-164.
14. Gan-Or Z., Ozelius L.J., Bar-Shira A. et al. The p.L302P mutation in the lysosomal enzyme gene SMPD1 is a risk factor for Parkinson disease. *Neurology* 2013; 80:1606-1610.
15. Ginns E.L., Mak S.K., Ko N. et al. Neuroinflammation and  $\alpha$ -synuclein accumulation in response to glucocerebrosidase deficiency are accompanied by synaptic dysfunction. *Mol. Genet. Metab.* 2014; 111:152-162.
16. Hamano K., Hayashi M., Shioda K., Fukutsu R., Mizutani S. Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. *Acta Neuropathol.* 2008; 115:547-559.
17. Ibáñez P., Lesage S., Janin S. et al. Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms. *Arch. Neurol.* 2009; 66:102-108.
18. Ischiropoulos H. Oxidative modifications of alpha-synuclein. *Parkinson's disease: the life cycle of the dopamine.* *Neuron* 2003; 99:93-100.
19. Kang S., Heo T.H., Kim S.J. Altered levels of  $\alpha$ -synuclein and sphingolipids in Batten disease lymphoblast cells. *Gene* 2014; 539:181-185.
20. Klunemann H.H., Nutt J.G., Davis M.Y., Bird T.D. Parkinsonism syndrome in heterozygotes for Niemann-Pick C1. *J. Neurol. Sci.* 2013; 335: 219-220.
21. Kruger R., Kuhn W., Muller T. et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alphasynuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 1998; 18:106-108.
22. Lee FJS, Liu F, Fristupa Z.B., Niznik H.B. Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis. *Faseb J.* 2001; 15:916-926.
23. Lesage S., Anheim M., Letournel F. et al. G51D  $\alpha$ -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol.* 2011; 73:459-471.
24. Luk K.C., Song C., O'Brien P. et al. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *PNAS* 2009; 106:20051-20056.
25. Lwin A., Orvisky E., Goker-Alpan O., LaMarca M., Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol. Genet. Metab.* 2004; 81:70-73.
26. Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I., et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science* 2000; 287:1265-1269.
27. Mazzulli J.R., Xu Y.H., Sun Y. et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and  $\alpha$ -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 2011; 146:37-52.
28. Nalls M.A., Duran R., Lopez G. et al. A multicenter study of glucocerebrosidase mutations in dementia with Lewy bodies. *JAMA Neurol.* 2013; 70:727-735.
29. Neudorfer O., Giladi N., Elstein D. et al. Occurrence of Parkinson's syndrome in type I Gaucher disease. *QJM* 1996; 89:691-694.
30. Nichols W.C., Pankratz N., Marek D.K. et al. Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology* 2009; 72:310-316.
31. Norris E.H., Giasson B.I., Ischiropoulos H., Lee V.M.Y. Effects of oxidative and nitrative challenges on alpha-synuclein fibrillogenesis involve distinct mechanisms of protein modifications. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:27230-27240.
32. Paleologou K.E., Oueslati A., Shakk G. et al. Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *J. Neurosci.* 2010; 30:3184-3198.
33. Parnetti L., Chiasserini D., Persichetti E. et al. Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and  $\alpha$ -synuclein in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2014 [Epub ahead of print].
34. Perez R., Waymire J.C., Lin E. et al. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci.* 2002; 22:3090-3099.
35. Proukakis C., Dudzik C.G., Brier T. et al. A novel  $\alpha$ -synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology.* 2013; 80:1062-1064.
36. Saito Y., Suzuki K., Huette C.M., Murayama S. Aberrant phosphorylation of alpha-synuclein in human Niemann-Pick type C1 disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63:323-328.
37. Sardi S.P., Clarke J., Viel C. et al. Augmenting CNS glucocerebrosidase activity as a therapeutic strategy for parkinsonism and other Gaucher-related synucleinopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013; 110:3537-3542.
38. Schöndorf D.C., Aureli M., McAllister F.E. et al. iPSC-derived neurons from GBA1-associated Parkinson's disease patients show autophagic defects and impaired calcium homeostasis. *Nat. Commun.* 2014; 5:4028.
39. Shachar T., Lo Bianco C., Recchia A. et al. Lysosomal storage disorders and Parkinson's disease: Gaucher disease and beyond. *Mov. Disord.* 2011; 26:1593-1604.
40. Sidransky E., Lopez G. The link between the GBA gene and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2012; 11:986-998.
41. Sidransky E., Nalls M.A., Aasly J.O. et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361:1651-1661.
42. Singleton A.B., Farrer M., Johnson J. et al. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302(5646):841.
43. Smith B.R., Santos M.B., Marshall M.S. et al. Neuronal inclusions of  $\alpha$ -synuclein contribute to the pathogenesis of Krabbe disease. *J. Pathol.* 2014; 232:509-521.
44. Suzuki K., Iseki E., Togo T. et al. Neuronal and glial accumulation of alpha- and beta-synucleins in human lipidoses. *Acta Neuropathol.* 2007; 114:481-489.
45. Tayebi N., Stubblefield B., Park J. et al. Reciprocal and nonreciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region: implications for complexity in Gaucher disease. *Am. J. Hum. Genet.* 2003; 72:519-534.
46. Waxman E.A., Giasson B.I. A novel, high-efficiency cellular model of fibrillar alpha-synuclein inclusions and the examination of mutations that inhibit amyloid formation. *J. Neurochem.* 2010; 113:374-388.
47. Winder-Rhodes S.E., Garcia-Reitböck P., Ban M. et al. Genetic and pathological links between Parkinson's disease and the lysosomal disorder Sanfilippo syndrome. *Mov. Disord.* 2012; 27:312-315.
48. Wu G., Pang S., Feng X. et al. Genetic analysis of lysosomal alpha-galactosidase A gene in sporadic Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2011; 500:31-35.
49. Yap T.L., Gruschus J.M., Velayati A. et al. Alpha-synuclein interacts with glucocerebrosidase providing a molecular link between Parkinson and Gaucher diseases. *J. Biol. Chem.* 2011; 286:28080-28088.
50. Zarranz J.J., Alegre J., Gomez-Esteban J.C. et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol.* 2004; 55:164-173.
51. Ziegler S., Eblan M., Gutti U. et al. Glucocerebrosidase mutations in Chinese subjects from Taiwan with sporadic Parkinson disease. *Mol. Genet. Metab.* 2007; 91:195-200.

# Оценка ассоциации полиморфной микросателлитной области *SNCA-Rep1* с развитием болезни Паркинсона в российской популяции

*М.С. Степанова, Е.Ю. Федотова, Н.Ю. Абрамычева, С.Н. Иллариошкин*

*Научный центр неврологии РАМН (Москва)*

Альфа-синуклеин, нейрональный пресинаптический белок, состоящий из 140 аминокислот, является основным компонентом телец Леви и патоморфологической характеристикой болезни Паркинсона (БП). Альфа-синуклеин обнаруживается в нервных окончаниях (главным образом в пресинаптических терминалиях и в значительно меньшей степени в телах нейронов и дендритах) и составляет около 1% общего белка мозга, предположительно участвует в процессах передачи сигнала, обучения и формирования памяти [1]. Многочисленные исследования — начиная от выявления ответственного за развитие заболевания локуса *PARK1* в итальянской семье с аутосомно-доминантной формой паркинсонизма [2] до современных полногеномных ассоциативных исследований (GWAS) — убедительно показали, что ген  $\alpha$ -синуклеина (*SNCA*), локализованный на хромосоме 4q21.3-q22, играет большую роль в развитии БП и других нейродегенеративных синуклеинопатий. Мутации в гене *SNCA* приводят к изменению его конформации, при этом белок приобретает новые свойства и структуру, что приводит к агрегации и образованию телец Леви [3]. Миссенс-мутации в гене *SNCA* [4,5], а также изменение дозы гена (дупликация и трипликация) ассоциированы с аутосомно-доминантным паттерном наследования БП [6]. Генетические варианты полиморфного региона Rep1, локализованного в промоторной области гена *SNCA*, ассоциированы со спорадическими формами БП [7].

Полиморфизм *SNCA-Rep1* состоит из микросателлитных повторов (TC)(TT)(TC)(TA)(CA), при этом число динуклеотидных повторов TC, TA и CA может варьировать; наиболее частые последовательности (TC)10(TT)1(TC)10(TA)8(CA)10 и (TC)10(TT)1(TC)10(TA)8(CA)11 были обозначены как аллели 0 (259) и 1 (261) [8]. Частота встречаемости аллелей полиморфизма *SNCA-Rep1* в различных популяциях существенно различается: в азиатских популяциях соотношение аллелей 259, 261 и 263 составляет, соответственно, 40%, 33% и 25% [9], тогда как в европейских популяциях — 22–32%, 58–72% и 3–9% [10]. По результатам метаанализа исследований европейских популяций [11], носительство аллеля Rep1-263 связано с увеличением риска развития паркинсонизма. В ряде исследований была выявлена связь между носительством аллеля 263 и уменьшением возраста начала заболевания, а также тенденцией к развитию депрессии и увеличению тяжести по шкале UPDRS [12, 13].

В модельных экспериментах установлена ассоциация полиморфных вариантов *SNCA-Rep1* с различиями в регуляции транскрипции *SNCA*, показано что уровень *SNCA*-mRNA и белка  $\alpha$ -синуклеина в клетках мозга достоверно повышается для аллелей 261 и 263 по сравнению с Rep-259 [14, 15].

**Целью** нашего исследования явилась оценка ассоциации полиморфной микросателлитной области гена *SNCA-Rep1* с развитием БП в российской популяции.

## Пациенты и методы исследования

В работе были обследованы 460 пациентов, страдающих БП (212 мужчин и 248 женщин; средний возраст 55,1  $\pm$  13,5 лет). Группа контроля состояла из 460 здоровых людей (232 мужчин и 228 женщин; средний возраст 46,7  $\pm$  10,9 лет). Образцы крови были взяты с информированного согласия исследуемых лиц.

Геномная ДНК выделялась из цельной крови с помощью набора для выделения Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega USA). Генотипирование динуклеотидных повторов проводили методом фрагментного анализа на капиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems/НІТАСНІ), используя размерный стандарт Liz 500, с помощью программного обеспечения Data Collection software версии v3.0. Полученные результаты обрабатывались при помощи программного обеспечения GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems).

Статистическая обработка данных проводилась в пакете прикладных программ STATISTICA8.0

## Результаты и обсуждение

Распределение частоты встречаемости аллелей в нашей контрольной группе (табл. 1) совпало с результатами, полученными в других европейских популяциях. Наиболее часто встречаемый аллель — Rep1-261. Аллель



Таблица 1. Частота встречаемости аллелей полиморфизма *SNCA-Rep1*.

Аллель	БП		Контрольная группа	
	%	n	%	n
255	0	0	0,10	1
257	0,2	2	0,22	2
259	26,0	241	28,8	264
261	66,4	611	66,1	608
<b>263</b>	<b>7,2*</b>	67	<b>4,5</b>	41
265	0,2	2	0,31	3

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по критерию хи-квадрат при сравнении с контрольной группой.

Таблица 2. Матрицы генотипов для БП и контрольной группы.

	БП (n = 460)						контроль (n = 460)					
	255	257	259	261	263	265	255	257	259	261	263	265
255	0						0					
257	0	0					0	0				
259	0	0	37				0	0	36			
261	1	1	148	209			1	2	184	192		
<b>263</b>	0	0	<b>18</b>	<b>41</b>	<b>3</b>		0	0	<b>8</b>	<b>33</b>	0	
265	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	0

263 достоверно чаще встречался у БП, чем в контрольной группе (7,2 и 4,5% соответственно; OR = 1,7; 95% CI = 1,11–2,48). Эти значения примерно соответствуют частоте аллеля Rep1-263 в европейской популяции и значительно ниже, чем в азиатской популяции. Различий по распределению частот встречаемости аллелей у пациентов женского и мужского пола не наблюдалось.

Распределение пациентов с БП и лиц контрольной группы по генотипам представлено в таблице 2. Варианты генотипов, содержащие аллель Rep1-263, более часто встречались в группе с БП по сравнению с контролем.

Достоверных различий по возрасту начала заболевания у пациентов с разными генотипами не наблюдалось. Было отмечено, что у мужчин с генотипом 259/261 наблюдалось несколько более раннее начало заболевания, чем у женщин с таким же генотипом.

Достоверных различий по тяжести заболевания у носителей различных генотипов также не наблюдалось. Протекторное действие аллеля Rep1-259, выявленное в некоторых исследованиях [16], в нашей работе установлено не было, хотя можно отметить, что у носителей генотипа 259/259, чаще всего встречался умеренный темп прогрессирования заболевания. У пациентов женского пола с генотипом 259/259 наблюдалось даже несколько более высокое значение по шкале Хен–Яр по сравнению с женщинами – носительницами других генотипов.

Таким образом, исследование гено-фенотипических корреляций для данного полиморфизма в гене *SNCA* должно быть продолжено с расширением групп пациентов с БП, представляющих различные этнические группы.

## Литература

- Corti O., Lesage S., Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol. Rev.* 2011; 91: 1161-1218.
- Polymereopoulos M.H., Higgins J.J., Golbe L.I. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-23. *Science* 1996; 274: 1197-1199.
- Stefanis L.  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 2012: 1-23.
- Polymereopoulos M.H., Lavedan C., Leroy E. et al. Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2045-2047.
- Fredenburg R.A., Rospigliosi C., Meray R.K. et al. The impact of the E46K mutation on the properties of  $\alpha$ -synuclein in its monomeric and oligomeric states. *Biochemistry* 2007; 46: 7107-7118.
- Miller D.W., Hague S.M., Clarimon J. et al.  $\alpha$ -Synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 2004; 62: 1835-1838.
- Maraganore D.M., de Andrade M., Elbaz A. et al. Collaborative analysis of  $\alpha$ -synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 2006; 296: 661-670.
- Chiba-Falek O., Nussbaum R.L. Effect of allelic variation at the NACP-Rep1 repeat upstream of the  $\alpha$ -synuclein gene (SNCA) on transcription in a cell culture luciferase reporter system. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10: 3101-3109.
- Mizuta I., Nishimura M., Mizuta E. et al. Meta-analysis of a synuclein/NACP polymorphism in Parkinson's disease in Japan. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2002; 73: 350.
- Farrer M., Maraganore, D.M., Lockhart, P. et al. Alpha-synuclein gene haplotypes are associated with Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2001; 10: 1847-1851.
- Maraganore D.M., de Andrade M., Elbaz A. et al. Collaborative analysis of  $\alpha$ -synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 2006; 296: 661-670.
- Hadjigeorgiou G.M., Xiromerisiou G., Gourbali V. et al. Association of  $\alpha$ -synuclein Rep1 polymorphism and Parkinson's disease: influence of Rep1 on age at onset. *Mov. Disord.* 2006; 21: 534-539.
- Pankratz N., Nichols W.C., Elsaesser V. E. et al. Alpha-synuclein and familial Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2009; 24: 1125-1131.
- Cronin K.D., Ge D., Manninger P. et al. Expansion of the Parkinson disease-associated SNCA-Rep1 allele upregulates human  $\alpha$ -synuclein in transgenic mouse brain. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18: 3274-3285.
- Linnertz C., Saucier L., Ge D. et al. Genetic regulation of  $\alpha$ -synuclein mRNA expression in various human brain tissues. *PLoS One* 2009; 4: e7480.
- Markopoulou E., Ahlskog J.E., Anderson K. et al. Genetic evidence for a dual and opposing effect of alpha-synuclein expression in preclinical versus clinical Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2013; 80: P05.059.

# Ассоциация «промежуточной» полиглутаминовой экспансии гена *ATXN2* (атаксин-2) с риском развития нейродегенеративных заболеваний в российской популяции

А.А. Мороз, М.С. Степанова, Е.В. Лысогорская, Е.Ю. Федотова,  
Н.Ю. Абрамчычева, С.А. Ключников, И.А. Иванова-Смоленская, С.Н. Иллариошкин

Научный центр неврологии РАМН (Москва)

Геном *ATXN2* на хромосоме 12q24.1, кодирующий белок атаксин-2, состоит из 30 экзонов. Первый экзон содержит полиглутаминовый тракт (CAG/CAA; полиQ), подверженный динамическим мутациям [1]. В норме число тандемных копий CAG-повторов варьирует от 14 до 28. «Полная» экспансия тринуклеотидных повторов (число CAG-копий больше 34) приводит к развитию классического полиглутаминового заболевания – аутосомно-доминантной спиноцереbellарной атаксии 2-го типа (СЦА2) [2]. «Промежуточный» интервал 28–33 повтора представляет собой «серую зону», которая, как неожиданно было показано в ряде недавних работ, является новым универсальным фактором риска развития целого ряда нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона (БП), боковой амиотрофический склерозом (БАС), прогрессирующий надъядерный паралич, мультисистемная атрофия, кортикобазальная дегенерация [3–5].

Показана экспрессия гена *ATXN2* в спинном и головном мозге, сердце, печени, скелетной мускулатуре, поджелудочной железе и плаценте. В головном мозге атаксин-2 обнаруживается в коре больших полушарий, мозжечке, хвостатом ядре, мозолистом теле, гиппокампе, таламусе, гипоталамусе, субталамических ядрах, черной субстанции. Установлено участие гена *ATXN2* и его продукта, атаксина-2, в процессах клеточного деления, формирования актиновых филаментов, апоптоза, клеточного сигналинга. Все описанные функции осуществляются путем контроля транскрипции мРНК в ядрах клеток; таким образом, именно нарушение процессов транскрипции и трансляции является основным звеном патогенеза нейродегенеративных нарушений, вызванных экспансией полиQ.

Одним из основных механизмов развития нейродегенеративных заболеваний является убиквитинирование патологических белков, агрегирующихся в цитоплазме или ядре клеток нервной ткани. Известно, что гиперфосфорилированные убиквитинированные формы белка TDP43 являются непосредственными субстратами при многих нейродегенеративных заболеваниях, таких как лобно-височная деменция, БП, спиноцереbellарные атаксии, БАС. [6]. В ряде работ в модельных экспериментах *in vitro* и *in vivo*, была выявлена четкая корреляция между состоянием гена *ATXN2* (степенью полиглутамин-кодирующей тринуклеотидной экспансии) и нейротоксичностью TDP43: так в клетках, несущих «промежуточное» число CAG-повторов (31–32), отмечался существенный рост концентрации нерастворимых форм TDP-43 и его C-концевых фрагментов по сравнению с клетками, характеризующимися нормальным или, напротив, патологически высоким числом повторов в гене *ATXN2* (т.е. «полной» экспансией гена) [7].

В виду существующего плейотропизма экспансии гена *ATXN2* мы провели оценку вклада вариабельного числа копий CAG-повторов в развитие БП и БАС в сравнении с СЦА2 в российской популяции.

## Пациенты и методы исследования

В работе были исследованы 445 пациентов, страдающих БП (254 мужчин и 191 женщина, средний возраст  $56,6 \pm 22,4$  лет), 200 пациентов с БАС (93 мужчин и 107 женщин, средний возраст  $51,6 \pm 13,5$  лет), 13 пациентов, страдающих СЦА2 (9 мужчин и 4 женщины, средний возраст  $37,3 \pm 11,0$  лет). Группа контроля включала 353 здоровых лиц (179 мужчин и 174 женщин, средний возраст  $46,7 \pm 10,9$  лет). Образцы крови были взяты с информированного согласия исследуемых лиц.

Геномная ДНК выделялась из цельной крови с помощью набора для выделения Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega USA). Генотипирование экспансии тандемных CAG-повторов проводили методом фрагментного анализа на капиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems/НПАСНИ), используя размерный стандарт Liz 500, с помощью программного обеспечения Data Collection software вер-

сии v3.0. Полученные результаты обрабатывались при помощи программного обеспечения GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems). При выявлении повышенного числа тринуклеотидных повторов ( $\geq 28$ ) проводили повторную амплификацию со следующими праймерами: прямой – 5'-CCCTACCATGTC GCTGAAGC-3' и обратный 5'-CGACGCTAGAAGGCCGCTG -3'; после разделения в агарозном геле вырезали ампликон большей длины и после очистки секвенировали для определения точного количества повторов и наличия вставок. Анализ нуклеотидной последовательности соответствующих образцов осуществлялся с помощью программного обеспечения Sequencing Analysis v. 5.2 (Applied Biosystems). Статистическая обработка данных проводилась в пакете прикладных программ STATISTICA8.0, Microsoft Office Excel 2007 и с использованием калькуляторов «EpiMax Table Calculator» <http://www.healthstrategy.com> и «Simple ROC Curve Analysis» <http://www.vassarstats.net/roc1.html>.

### Результаты и обсуждение

СЦА2 – вторая по частоте форма аутосомно-доминантных мозжечковых атаксий (15% всех случаев), характеризуется нарушением походки, дизартрией, надъядерной офтальмоплегией, снижением рефлексов и развитием деменции [8]. Типичными являются изменения коры мозжечка, ядер моста, нижних олив, а также черной субстанции. К развитию заболевания приводит гетерозиготное носительство аллеля, несущего более 34 копий тандемных CAG-повторов, мутантный ген обладает почти 100% пенетрантностью.

Анализ нашей выборки больных СЦА2 во всех случаях показал гетерозиготное носительство «полной» мутации: нормальный вариант аллеля – 23 копии повторов, мутантный – 37, 38, 39, 40, 41, 42 либо 44 копии CAG-повторов (наиболее частый генотип – 23/41), при этом поли-CAG последовательность не прерывалась вставками других нуклеотидных триплетов. Минимальное число повторов, ассоциированное с развитием СЦА-2, составило 37, что немного выше, чем для других изученных популяций (рисунок).

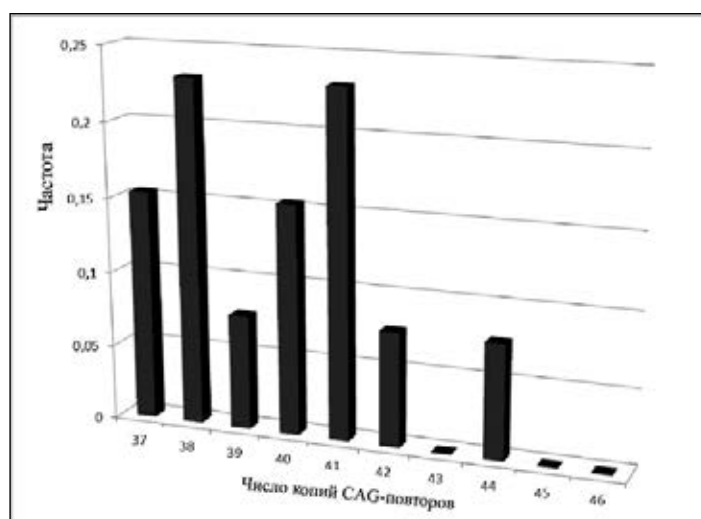


Рисунок. Распределение частот мутантных аллелей гена *ATXN2* у больных СЦА2.

При анализе клинической картины заболевания у больных из нашей выборки не было выявлено взаимосвязи между наличием определенного числа повторов и специфическими клиническими проявлениями атаксии. Однако была выявлена обратная зависимость между степенью экспансии CAG-повторов и возрастом дебюта заболевания.

Обсуждаемый в литературе в последнее время вопрос о вероятном вкладе гена *ATXN2* в патогенез таких заболеваний, как БП и БАС [9] побудил нас провести аналогичное исследование на нашей популяции. В итоге в нашей выборке больных БП выявлено 18 случаев носительства «промежуточного» аллеля *ATXN* в гетерозиготном состоянии (4,04%,  $p=0,046$ , OR 2,93, 95% CI 1,01–9,12): нормальный аллель содержал 22, 23, 24 либо 26 повторов, мутантный – 28, 30 либо 32 повтора (88,89%, 5,56% и 5,56%, соответственно). В выборке пациентов, страдающих БАС, выявлено 11 случаев гетерозиготного носительства «промежуточного» аллеля гена *ATXN* (5,5%,  $p=0,026$ , OR 3,37, 95% CI 1,13–10,39): нормальный аллель был представлен 23 либо 24 CAG-триплетами, мутантный – 28, 30 либо 32 триплетами (63,6%, 18,2% и 18,2%, соответственно). В контрольной группе выявлено 5 случаев гетерозиготного носительства «промежуточного» аллеля *ATXN* (1,4%).

Поли-СAG последовательность данного гена полиморфна не только лишь за счет длины (числа тандемных копий) тринуклеотидных повторов, но и за счет наличия САА-вставок различной локализации. Как правило, число вставок колеблется от одной до трех. Чаще всего такая вставка единична, располагается ближе к 3' концу, и ей предшествует 8 СAG-повторов. В случае наличия двух САА-вставок они располагаются, как правило, в положении 8-1-4-1-8, т.е. между восемью СAG-триплетами от начала и конца последовательности – разделенные четырьмя СAG-вставками. Различные вариации возникают за счет наличия еще одного СAG-триплета в какой-либо из трех зон. По результатам анализа большого числа неврологически здоровых людей было обнаружено около 15 вариантов данной полиморфной области, однако, наиболее частыми являлись следующие: 8-1-4-1-8 и 13-1-8, они встречались в 90% случаев [10, 11].

Результаты секвенирования найденных нами «промежуточных» аллелей данного гена показали, что последовательность СAG-повторов *ATXN2* в таких аллелях, аналогично нормальным аллелям в популяции, прерывается САА-вставками (таблица). Расположены эти вставки симметрично, в девятой позиции с 3'-конца участка экспансии, через каждые четыре СAG-триплета, в большинстве случаев «промежуточные» аллели содержат 3 копии САА-вставок.

**Таблица. Варианты расположения САА-вставок в СAG-последовательностях первого экзона гена *ATXN2* в выборках больных БП, БАС и контроле.**

Число СAG-повторов	Нуклеотидная последовательность	Число САА вставок	БП (n)	БАС (n)	Конт-роль (n)
28	(CAG)8CAA(CAG)4CAA(CAG)14	2	3	2	1
	(CAG)8CAA(CAG)4CAA(CAG)4CAA(CAG)9	3	13	4	3
29	(CAG)8CAA(CAG)20	1	-	-	1
30	(CAG)8CAA(CAG)4CAA(CAG)16	2	-	1	-
	(CAG)8CAA(CAG)4CAA(CAG)4CAA(CAG)11	3	1	2	-
32	(CAG)32	0	-	1	-
	(CAG)8CAA(CAG)23	1	1	1	-
Общее количество проанализированных образцов			445	200	353

Анализ клинических проявлений БП у пациентов из нашей выборки позволил выявить некоторые отличительные черты *ATXN2*-ассоциированной формы болезни: раннее начало заболевания; асимметричная манифестация, чаще с тремора одной руки и значительно реже с брадикинезии (по литературным данным, среди случаев БП, ассоциированных с мутациями в гене *ATXN2*, превалирует акинетико-ригидная форма [12]); медленное прогрессирование; преобладание у пациентов женского пола; хороший отклик на леводопа-терапию.

Для пациентов с БАС не удалось выявить каких-либо отличительных особенностей форм заболевания, ассоциированных с носительством «промежуточного» аллеля *ATXN2*. Средний возраст дебюта заболевания составил 40 лет, что немного ниже, чем описано для классической спорадической формы болезни, однако симптоматика заболевания не отличалась от классических форм БАС. В выборке преобладала спинальная форма заболевания.

Проведенный скрининг позволяет рассматривать наличие «промежуточной» экспансии СAG-повторов в гене *ATXN2* как фактор риска развития БП и БАС в российской популяции, что свидетельствует об общности ряда молекулярных механизмов патогенеза нейродегенеративной патологии.

**Благодарность.** Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-01718.

#### Литература

1. Imbert G., Saudou F., Yvert G. et al. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat. Genet.* 1996; 14: 285-291.
2. Geschwind D.H., Perlman S., Figueroa C.P. et al. The prevalence and wide clinical spectrum of the spinocerebellar ataxia type 2 trinucleotide repeat in patients with autosomal dominant cerebellar ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 60: 842-850.
3. Furtado S., Payami H., Lockhart P.J. et al. Profile of families with parkinsonism-predominant spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2). *Mov. Disord.* 2004; 19: 622-629.
4. Infante J., Berciano J., Volpini V. et al. Spinocerebellar ataxia type 2 with levodopa-responsive parkinsonism culminating in motor neuron disease. *Mov. Disord.* 2004; 19: 848-852.
5. Nanetti L., Fancellu R., Tomasello, C. et al. Rare association of motor neuron disease and spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2): a new case and review of the literature. *J. Neurol.* 2009; 256: 1926-1928.
6. Ross O.A., Rutherford N.J., Baker M. et al. Ataxin-2 repeat-length variation and neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20: 3207-3212.
7. Shieh S.Y., Bonini N.M. Genes and pathways affected by CAG-repeat RNA-based toxicity in *Drosophila*. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20: 4810-4821.
8. Lastres-Becker I., Rub U., Auburger G. Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Cerebellum* 2008; 7: 115-124.
9. Lee T., Li Y.R., Ingre C. et al. Ataxin-2 intermediate-length polyglutamine expansions in European ALS patients. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20: 1697-1700.
10. Kim J.M., Hong S., Kim G.P. et al. Importance of low-range CAG expansion and CAA interruption in SCA2 parkinsonism. *Arch. Neurol.* 2007; 64: 1510-1518.
11. Sobczak K., Krzyzosiak W.J. CAG repeats containing CAA interruptions from branched hairpin structures in spinocerebellar ataxia type 2 transcripts. *J. Biol. Chemistry* 2005; 280: 3898-3910.
12. Wu T., Wang C., Hallett M. et al. Preclinical and clinical neural network changes in SCA2 parkinsonism. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2013; 19: 158-164.

# Транскриптомные маркеры ранней стадии болезни Паркинсона

М.И. Шадрина<sup>1</sup>, А.Х. Алиева<sup>1</sup>, Е.В. Филатова<sup>1</sup>, А.В. Карабанов<sup>2</sup>,  
А.А. Колачева<sup>3</sup>, С.Н. Иллариошкин<sup>2</sup>, М.В. Угрюмов<sup>3</sup>, П.А. Сломинский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной генетики РАН; <sup>2</sup>Научный центр неврологии РАМН;

<sup>3</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (Москва)

В настоящее время не вызывает сомнения, что важную роль в развитии болезни Паркинсона (БП) играют генетические факторы. На это в первую очередь указывает наличие семейных форм БП. По разным данным считается, что семейная форма составляет от 10 до 20% от всех случаев БП [5, 10]. При этом анализ семей с БП показал, что сочетание сходного генетического фона и образа жизни повышает риск развития заболевания у родственников больных идиопатическим паркинсонизмом в 3–14 раз по сравнению с контролем [11].

На данный момент в геноме человека выявлен целый ряд генов, так или иначе вовлеченных в этиологию и патогенез БП. Для семи из этих генов (*SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *PARK7*, *LRRK2*, *ATP13A2*, *VSP35*) точно определен характер наследования и выявлены мутации, приводящих к развитию моногенных форм первичного паркинсонизма. Для трех генов (*SNCA*, *PARK2* и *MAPT*) выявлены полиморфизмы, значительно повышающие риск развития спорадической формы заболевания во многих популяциях мира, и для одного гена – *GBA* – выявлены мутации с неполной пенетрантностью, приводящие к развитию БП (таблица 1).

Анализ возможных функций ключевых генов патогенеза БП, представленных в таблице 1 и рисунке 1, позволяет предположить, что, наряду с нарушением процессов нормального функционирования митохондрий и механизмов протеолиза, весьма значительную роль в патогенезе БП может играть также нарушение процессов везикулярного синаптического транспорта и нормального функционирования синапса. Кроме того, как видно на рисунке 1, дегенеративные феномены могут развиваться или непосредственно в соме нейрона, или на периферии нейрона. Однако до сих пор остаются не решенными два очень важных вопроса: где начинаются процессы нейродегенерации – в соме нейрона или на его периферии, и какие именно процессы запускают развитие патологического процесса.

Таблица 1. Ключевые гены болезни Паркинсона.

Локус	Ген/ Белок	Наследование	Возможная функция
PARK1/ PARK4	<i>SNCA</i> / $\alpha$ -синуклеин	АД	Пресинаптический белок, компонент телец Леви, играет важную роль в экзо- и эндоцитозе
PARK2	<i>PARK2</i> / Паркин	АР	Убиквитин Е3 лигаза, играет важную роль в убиквитин-зависимом протеолизе и митофагии
PARK6	<i>PINK1</i> / Серин/треонин-протеинкиназа PINK1	АР	Митохондриальная протеинкиназа, играет важную роль в митофагии
PARK7	<i>PARK7</i> / Белок DJ-1	АР	Шаперон, является сенсором оксидантного стресса и защищает клетки от токсических воздействий
PARK8	<i>LRRK2</i> / Киназа 2 с лейцин богатыми повторами, дардарин	АД	Протеин киназа, принимает участие в контроле над обменом синаптических везикул и динамикой цитоскелета, в функционировании митохондрий, лизосом и аппарата Гольджи
PARK9	<i>ATP13A2</i> / АТФаза 13A2	АР	Лизосомная АТФаза, играет важную роль в лизосомной аутофагии
–	<i>VSP35</i> / Вакулярный белок VSP35	АД	Обеспечивает обратный транспорт эндосом к комплексу Гольджи
–	<i>GBA</i> / Бета- глюкоцереброзидаза	–	Принимает участие в лизосомной аутофагии
–	<i>MAPT</i> / Белок тау	–	Играет важную роль в формировании и поддержании цитоскелета

Примечание: АД – аутосомно-доминантное; АР – аутосомно-рецессивное.



Известно, что процессы нейродегенерации при БП развиваются очень медленно. В настоящее время показано, что может пройти около двадцать лет с момента запуска нейродегенеративных процессов до проявления первых классических двигательных симптомов заболевания, по которым в настоящее время ставится диагноз [7, 8]. В связи с этим, при анализе больных БП исследователь имеет дело уже с развернутой картиной патологического процесса и не может видеть того, что происходит в самом начале развития нейродегенеративного процесса. Одним из возможных подходов к изучению патогенеза болезни БП и поиску ответа на поставленные вопросы является изучение моделей заболевания.

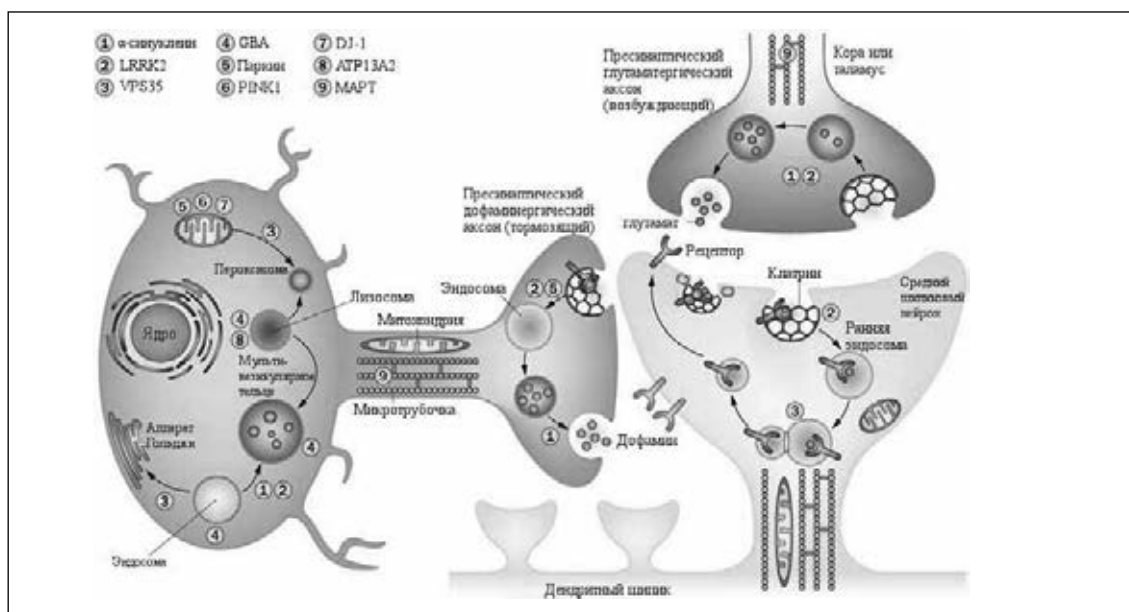


Рисунок 1. Ключевые гены и процессы, вовлеченные процессы развития БП [13].

На сегодняшний день создано большое количество моделей БП, которые в целом можно разделить на две большие группы: токсические и генетические модели. Необходимо отметить, что ни одна из существующих моделей не является совершенной — хотя бы потому, что никто, кроме человека, не болеет БП. Для проведения своих работ мы остановились на токсической модели паркинсонизма, так как, в отличие от генетических моделей, с их помощью намного лучше воспроизводятся патологические и поведенческие изменения, характерные для БП, и они моделируют более общие механизмы патогенеза заболеваний.

При этом нами был проведен анализ транскриптома в тканях черной субстанции и стриатума мозга мышей с МФТП-индуцированных досимптомной (ДС) и ранней симптомной (РС) стадиями БП с помощью чипов MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip Kit (Illumina). Данная модели были созданы путем двукратного и четырехкратного введение токсина соответственно мышам линия C57BL/6 в дозе 12 мг/кг [14] (смотри рисунок 2). При этом у мышей с ДС стадией наблюдается деградация 27% тел нейронов, снижение уровня дофамина на 60% в стриатуме, а развития моторных симптомов еще нет, в то время как у мышей с РС стадией наблюдается уже деградация 43% тел нейронов, снижение дофамина на 75% в стриатуме и развитие моторной симптоматики [14].

Был проведен анализ двух опытных и контрольной групп мышей (по 10 животных в каждой группе). Животные были декапитирована через 2 недели после введения токсина (или физиологического раствора в случае контрольной группы). Первичный анализ данных, полученных на чипах MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip Kit, проведен с использованием программного обеспечения Genome Studio (Illumina). В результате такого анализа было отобрано 500 транскриптов с изменением их представленности в 1,5 и более раза и  $p\text{Val} < 0,05$ . Для дальнейшего анализа панели дифференциально экспрессирующихся генов была использована база данных DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). Эта база данных позволяет проводить быстрое аннотирование любых интересующих исследователя генов и объединять их по функциональным группам. Такая функциональная кластеризация дает возможность выявить основные биологические процессы и гены, изменяющиеся в ответ на те, или иные воздействия. При этом необходимо отметить, что при кластеризации проводили анализ всех генов, уровень экспрессии которых достоверно изменился в соответствии с заданными критериями. При этом не учитывается ни конкретная величина изменения уровня экспрессии, ни ее направление. Отбирались процессы с наиболее вы-



Рисунок 2. Схема введения МФТП для создания МФТП-индуцированных моделей с досимптомной и ранней симптомной стадиями БП.

сокой оценкой обогащения (Enrichment Score) (N-Fold=2.0, pVal<0.05). Высокое значение этого критерия указывает на большую вероятность того, что гены из исходного списка вовлечены в соответствующий метаболический процесс. В результате были отобраны шесть наиболее значимых метаболических процессов. Для двух из них – митохондриальной дисфункции и убивиктин-зависимого протеолиза – ранее уже были получены убедительные и неоднократно подтвержденные данные об их участии в процессах нейродегенерации, что указывает на адекватность используемых нами моделей. Для четырех процессов – синаптической передачи, катаболизма белков, везикулярного транспорта и локализации клеточных компонентов – мы пока еще только можем предполагать их возможную роль в патогенезе БП. Для дальнейшего анализа мы в большей степени сфокусировали свое внимание именно на этих четырех предполагаемых метаболических путях. Были проанализированы гены, вошедшие в эти пути, и отобраны 52 гена с наиболее выраженными изменениями экспрессии (смотри таблицу 2).

Таблица 2. Список генов, статистически значимо изменивших экспрессию в мозге мышей с досимптомной и ранней нейротоксическими симптомной моделями БП.

Ген	Белок	Досимптомная стадия		Ранняя симптомная стадия	
		Черная субстанция	Стриатум	Черная субстанция	Стриатум
Abat	4-aminobutyrate aminotransferase	0,618655	0,583762		0,550856
Copq	coatamer protein complex, subunit gamma		0,577089		0,659786
Drd2	dopamine receptor 2	0,467275		0,579688	
Gabrb1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 1		0,523679		0,479547
Gabrd	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit delta		0,657249		1,662353
Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 1		0,387553		0,579934
Gabrg2	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit gamma 2		0,609644	1,710547	0,448166
Gipc1	GIPC PDZ domain containing family, member 1			1,503513	0,515371
Gria1	glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1); similar to glutamate receptor, ionotropic, AMPA1 (alpha 1)	0,561547	0,471374		

Gria2	glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2)	0,518095	0,645661		0,654997
Homer1	homer homolog 1 (Drosophila)		0,64011		0,47727
Nln	neurolysin (metallopeptidase M3 family)			0,460141	0,528267
Cacnb4	calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit		0,665701		0,665261
Crbn	Cereblon	0,653333	0,395062		0,479438
Kcna2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 2	0,449927			0,579741
Clb2	calbindin 2		0,653488		0,384853
Cplx2	complexin 2		1,990991		2,35053
Exoc4	exocyst complex component 4	0,62783	0,532949		1,506449
Scamp5	secretory carrier membrane protein 5		0,40393		0,501506
Sv2b	synaptic vesicle glycoprotein 2 b	0,521528	0,617863		
Stx12	syntaxin 12	0,626997		0,662139	
Stxbp1	syntaxin binding protein 1		0,52183		0,640558
Rab5a	RAB5A, member RAS oncogene family; similar to small GTP-binding protein rab5	0,652241			0,506579
Nsf	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein		0,584899		0,56442
Syt11	synaptotagmin XI; similar to synaptotagmin XI		0,623772		0,500992
Snca	synuclein, alpha	0,528649	0,576003	1,657051	0,495473
Lin7b	lin-7 homolog B (C. elegans)	0,638298	0,586207		1,640523
Klk8	kallikrein related-peptidase 8	1,578313	1,574713		
Epsn2	epsin 2		1,5625		0,580033
Ap1s1	adaptor protein complex AP-1, sigma 1	1,707463			0,656004
Ap2a1	adaptor protein complex AP-2, alpha 1 subunit			0,594986	0,607143
Necap1	NECAP endocytosis associated 1	0,594046	0,551476		0,447101
Aftph	aftiphilin	0,617748	0,525013		
Rab8b	RAB8B, member RAS oncogene family	0,503292	0,48761	0,636929	0,578462
Rabep1	rabaptin, RAB GTPase binding effector protein 1			0,390826	0,59798
Slc27a1	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 1	0,539303			0,640237
Snx18	sorting nexin 18	0,517996	0,564692		
Kif1b	kinesin family member 1B	1,609865	0,618436	1,767647	
Cyld	cyldromatosis (turban tumor syndrome)	0,628159	0,623312		
Trim9	tripartite motif-containing 9		1,596745		0,655738
Uchl3	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)	0,53644	0,34331		0,519467
Ubr7	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 7 (putative)	0,566447	0,644068		0,665375
Ube3c	ubiquitin protein ligase E3C	0,522593	0,470854		0,633855
Usp19	ubiquitin specific peptidase 19		0,560942		0,659359
Usp39	ubiquitin specific peptidase 39	0,396509		0,657554	0,458543
Gm15361, Gm4596 pseudogenes	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast); similar to UBE2D3; predicted gene 4596; predicted gene 15361	0,630522	0,64466		0,628724

Ube2g1	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 1 (UBC7 homolog, <i>C. elegans</i> )	0,660996	0,601685		0,654988
Ube2k	ubiquitin-conjugating enzyme E2K (UBC1 homolog, yeast)	0,637179	0,336174	0,504986	0,510327
Ube2m	ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast)		0,506452	0,589295	0,546037
Ufc1	ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1		0,424925		0,661048
Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	0,470494	0,378691	0,568187	0,543823
Pex5	peroxisomal biogenesis factor 5	0,620332	0,616842	0,548889	0,554902

Как видно из таблицы 2, как в чёрной субстанции, так и в стриатуме наблюдается преимущественно снижение экспрессии генов в обеих нейротоксических моделях БП у мышей. При сравнении экспрессии генов в чёрной субстанции мозга мышей с досимптомной и ранней симптомной моделями БП было показано, что на досимптомной стадии с формированием патологической картины связано большее количество генов, чем на ранней симптомной стадии. В то же время, сравнение двух тканей (чёрной субстанции и стриатума) мозга мышей с нейротоксическими моделями БП показало, что в стриатуме наблюдается изменения в уровнях мРНК большего числа генов по сравнению с чёрной субстанцией, и эта закономерность характерна для обеих моделей. Мы провели детальный анализ общего списка генов (таблица 2), и выделили семь генов, которые показали выраженные изменения экспрессии как минимум в двух точках (такнь/стадия) и функции которых позволяют предполагать их важную роль в формировании патологических процессов при БП: *Drd2*, *Clb2*, *Cplx2*, *Exoc4*, *Snca*, *Epn2*, *Ntrk2*. Более подробные характеристики представлены в таблице 3.

Таблица 3. Функции отобранных генов.

Ген	Белок	Предполагаемая функция
<i>Snca</i>	Альфа-синуклеин	Пресинаптический белок, компонент телец Леви
<i>Drd2</i>	Рецептор к дофамину D2	Ингибитор высвобождения дофамина, рецептор обратного захвата дофамина
<i>Epn2</i>	Эпсин 2	Клатрин-зависимый эндоцитоз
<i>Cplx2</i>	Комплексин 2	Экзоцитоз синаптических везикул
<i>Exoc4</i>	Компонент экзоцитозного комплекса 4	Компонент экзоцитозного комплекса
<i>Calb2</i>	Кальбиндин 2	Регулятор концентрации Ca <sup>2+</sup>
<i>Ntrk2</i>	Рецептор к нейротрофической тирозинкиназе, тип 2	Процессы жизнедеятельности клеток нервной системы

Далее мы провели детальный анализ уровней мРНК этих генов в тканях коры полушарий, стриатума и чёрной субстанции мозга мышей с МФТП-индуцированными моделями ДС и РС стадиях БП, с использованием ПЦР в реальном времени. Для этого тотальную РНК выделяли из чёрной субстанции и стриатума мозга мышей с помощью набора QIAamp RNA Mini Kit («Qiagen», Германия). Количество РНК определяли спектрофотометрически с применением набора Quant-iT RNA BR Assay Kit и флюориметра Qubit («Invitrogen», США). Одноцепочечную кДНК синтезировали трижды с применением набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit («Thermo Fisher Scientific Baltics», Литва) и 50 нг тотальной РНК. Необходимо упомянуть, что каждый образец ткани был проанализирован в трех независимых повторах для коррекции разницы в эффективности реакции обратной транскрипции. Относительный уровень экспрессии генов анализировали с помощью ПЦР в реальном времени, основанной на технологии TaqMan. Транскрипты генов *Polr2f* и *Psmb6* амплифицировали совместно с транскриптом исследуемого гена как гены сравнения для нормализации данных по экспрессии исследуемого гена. Праймеры и зонды разрабатывали с помощью программного обеспечения Beacon Designer 7.02. ПЦР проводили с использованием прибора АНК-32 (Институт аналитического приборостроения, Россия) и реактивов для ПЦР («Синтол», Россия). Все реакции повторяли троекратно для каждой кДНК. Значения пороговых уровней

амплификации (Cp – Crossing point) анализировали с помощью метода максимума второй производной, являющегося частью программного обеспечения «АНК 32 для Windows», версия 1.1. Расчет относительных количеств транскриптов изучаемых генов проводили по формуле  $R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$  согласно методу сравнения Cp. Данные анализировали с помощью непараметрического критерия U Манна-Уитни, все вычисления выполнены с применением программного обеспечения Statistica 8.0.

Результаты исследования относительной экспрессии исследованных генов представлены в таблице 4.

**Таблица 4. Относительный уровень экспрессии отобранных генов в тканях мозга мышей с МФТП-индуцированными ДС и РС стадиями БП.**

Ткань	Кора полушарий		Стриатум		Черная субстанция	
	ДС	РС	ДС	РС	ДС	РС
<i>Drd2</i>	<b>4,16 (3,84-8,38)</b>	0,79 (0,57-5,09)	0,90 (0,17-1,09)	<b>0,42 (0,33-0,86)</b>	<b>3,55 (3,14-5,80)</b>	<b>0,27 (0,13-0,59)</b>
<i>Calb2</i>	<b>7,38 (6,81-10,23)</b>	0,37 (0,19-1,89)	0,42 (0,36-1,05)	1,24 (0,80-1,45)	<b>4,04 (1,58-4,62)</b>	<b>0,54 (0,27-0,75)</b>
<i>Cplx2</i>	1,46 (1,24-1,73)	0,96 (0,30-1,55)	<b>3,06 (0,50-4,30)</b>	<b>2,37 (1,26-2,89)</b>	1,66 (0,55-1,73)	<b>0,61 (0,17-0,68)</b>
<i>Epn2</i>	3,16 (2,98-6,74)	<b>0,24 (0,20-0,40)</b>	<b>1,42 (1,22-2,77)</b>	0,82 (0,72-1,33)	1,53 (0,82-2,36)	<b>0,73 (0,33-0,78)</b>
<i>Exo4</i>	<b>2,59 (2,26-2,06)</b>	<b>0,30 (0,19-0,91)</b>	0,81 (0,17-1,09)	0,72 (0,59-0,85)	1,34 (0,41-1,78)	<b>0,26 (0,10-0,40)</b>
<i>Ntrk2</i>	<b>9,97 (8,892-11,35)</b>	0,61 (0,51-2,48)	1,20 (0,24-1,83)	2,23 (0,93-2,45)	<b>3,42 (1,01-4,03)</b>	<b>0,19 (0,15-0,51)</b>
<i>Sncα</i>	<b>10,66 (10,18-11,06)</b>	<b>0,30 (0,25-0,36)</b>	0,93 (0,12-1,00)	0,73 (0,61-1,30)	<b>7,52 (6,42-8,36)</b>	<b>0,17 (0,16-0,36)</b>

Примечание: ДС – досимптомная стадия; РС – ранняя симптомная стадия. Результаты представлены в виде Медианы (25–75%). Относительный уровень мРНК в контроле принят за единицу.

Как видно из представленных данных, для всех семи генов были выявлены статистически значимые изменения в экспрессии в трех и более точках. Обращает на себя внимание и то, что в черной субстанции мозга мышей с РС стадией все полученные нами данные являются статически достоверными.

Наибольшее количество статистически значимых изменений уровней мРНК было получено для гена *Drd2*, который играет важную роль в обратном захвате дофамина из синаптической щели и входит в состав эндоплазматических везикул.

Кроме того детальный анализ полученных данных по изменению экспрессии отобранных генов позволил выявить следующие интересные закономерности. Для двух тканей – коры больших полушарий и черной субстанции – наблюдается идентичный спектр изменений уровней мРНК для все проанализированных генов. Так, на ДС стадии наблюдается рост уровней мРНК в этих тканях по сравнению с контролем. В то же время на РС стадии наблюдается выраженное снижение относительной экспрессии анализируемых генов как в черной субстанции, так и в коре головного мозга. Причем наблюдаемое снижение экспрессии генов в черной субстанции вряд ли связано с уменьшением количества нейронов из-за их гибели, так как подобные изменения наблюдаются и для нейронов коры полушарий, гибель которых еще не происходит. И наблюдаемые нами изменения экспрессии в черной субстанции либо непосредственно задействованы в процессах нейродегенерации, либо являются их следствием.

Для четырех генов – *Drd2*, *Exo4*, *Epn2*, *Sncα* – нами был выявлен одинаковый спектр изменений уровней их мРНК во всех изученных тканях на обеих стадиях развития нейродегенеративного процесса. При этом на ДС стадии в телах дофаминергических нейронов, расположенных в черной субстанции, наблюдается усиление экспрессии, что указывает на включение компенсаторных механизмов, приводящих к тому, что в аксонах дофаминергических нейронов (в стриатуме) наблюдается нормальный уровень мРНК, несмотря на начавшиеся процессы нейродегенерации. На более поздней стадии компенсаторных возможностей нервных клеток уже не хватает и происходит уменьшение уровней мРНК и усиление процессов нейродегенерации.

Как уже упоминалось раньше, ни одна из существующих моделей БП не является совершенной и не может в полной мере отражать все процессы, протекающие в организме человека. В связи с этим необходимо проводить изучение транскриптома в доступных тканях больных БП для поиска новых генов вовлеченных в патогенез БП и верификации данных полученных при изучении модельных объектов. В последние годы изучение изменения экспрессии генов при БП у человека проводится, главным образом, на аутопсийном материале. Однако полученные при этом данные об изменении экспрессии генов отражают самые поздние стадии БП. В настоящее время не менее актуален анализ изменения экспрессии генов в более доступных тканях организма, например, цереброспинальной жидкости и крови. Это значительно упрощает работу по формированию, как выборки больных, так



и групп сравнения. Появляется также возможность проводить анализ на разных стадиях развития заболевания, в том числе и на самых ранних, до начала медикаментозного лечения.

Клетки крови, в частности лимфоциты, содержат некоторые характеристики, свойственные дофаминергическим нейронам: в них содержатся оба фермента синтеза дофамина, мембранный переносчик дофамина и экспрессируется ряд рецепторов дофамина [2, 3] Это позволяет предположить, что изменения, обнаруженные в периферической крови больных БП, могут отражать те процессы, которые протекают в дофаминергических нейронах черной субстанции. Поэтому нами был проведен анализ относительной экспрессии генов различных генов в периферической крови различных генов-кандидатов. В список изучаемых нами генов вошли как гены моногенных форм БП (*SNCA*, *PINK1*, *PARK7*, *LRRK2*, *ATP13A2*), так и гены-кандидаты, связанные с функционированием митохондрий, нарушение которого может быть вовлечено в патогенез заболевания.

В настоящей работе было проанализировано 38 пациентов с недавно поставленным диагнозом БП (1–2 стадия БП по шкале Хен и Яра), из них 20 пациентов были еще без лечения лечению и 18 пациентов уже начали терапию противопаркинсоническими препаратами. В качестве групп сравнения в работе исследовались следующие выборки:

а) 21 пациент с различными неврологическими заболеваниями (боковой амиотрофический склероз, болезнь Мари–Шарко, болезнь Вильсона–Коновалова, спиноцеребеллярные атаксии и др.);

б) группа контроля, состоящая из 24 неврологически здоровых добровольцев, соответствующих по полу, возрасту и этнической принадлежности пациентам.

Все больные являлись русскими по происхождению. Для постановки диагноза БП пациенты были исследованы по международной унифицированной оценочной шкале БП (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS) и шкале Хен–Яра (Hoehn and Yahr [6, 8]). Образцы крови были взяты с информированного согласия пациентов. Исследование было одобрено этическим комитетом Научного центра неврологии РАМН.

Для выделения тотальной РНК из цельной крови человека кровь забирали в 8 часов утра натощак, затем хранили перед выделением нуклеиновых кислот не больше 2 часов при +4°C. Выделение проводили с использованием набора ZR Whole-Blood Total RNA Kit™ («Zymo Research Corp.», США) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию выделенной тотальной РНК измеряли с помощью набора Quant-iT RNA BR Assay Kit и флуориметра Qubit («Invitrogen», США). Анализ экспрессии генов проводили с использованием реакции обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени с использованием TaqMan зондов. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase kit («Fermentas», Литва), 50 нг тотальной РНК и соответствующего обратного праймера согласно рекомендациям производителя. ПЦР в реальном времени проводили на приборе АНК-32 (Институт аналитического оборудования, Россия) и с использованием реактивов для ПЦР в реальном времени (Синтол, Москва, Россия). Для проведения амплификации использовали следующий режим: 50 °С – 60 с, 95 °С – 600 с, далее 45 циклов 95 °С, 20 с и 60 °С, 50 с. Каждый образец был проанализирован трижды для коррекции различий в качестве образцов и эффективности реакции обратной транскрипции. Гены были отобраны на основе литературных и биоинформатических данных. Последовательности праймеров и зондов были подобраны с помощью программы Beacon designer 7.0 «Premier Biosoft International» (Palo Alto, USA).

Расчет относительных уровней экспрессии в исследуемых группах проводился с использованием метода сравнения пороговых уровней амплификации  $\Delta\Delta C_t$  и формулы  $R = 2^{-\Delta\Delta C_p}$  (Applied Biosystems, 2001). Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ «Statistica for Windows 8.0» (StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0 (www.statsoft.com) и программного обе-

Таблица 5. Анализ относительных уровней экспрессии исследуемых генов.

Ген	Уровень экспрессии у пациентов без лечения, Me* (25%–75%)**	Уровень экспрессии у пациентов на лечении, Me (25%–75%)	Уровень экспрессии в группе неврологического контроля, Me (25%–75%)
<i>ALDH1A1</i>	1.08 (0.71-1.53)	1.60 (0.94-2.08)	0.95 (0.33-1.64)
<i>ATP13A2</i>	<b>1.94 (1.43-3.03)</b>	<b>2.14 (1.29-4.86)</b>	0.86 (0.46-1.62)
<i>LRRK2</i>	0.44 (0.31-1.26)	0.56 (0.41-1.42)	0.83 (0.37-1.35)
<i>PARK7</i>	<b>1.68 (0.96-2.51)</b>	<b>1.60 (1.32-2.20)</b>	1.00 (0.64-1.50)
<i>PINK1</i>	<b>0.75 (0.25-1.40)</b>	<b>1.29 (0.28-3.37)</b>	0.26 (0.12-0.56)
<i>PDHB</i>	1.46 (0.65-2.16)	<b>2.10 (0.58-2.36)</b>	1.32 (1.01-1.55)
<i>SNCA</i>	0.24 (0.06-1.16)	0.16 (0.04-0.24)	0.14 (0.02-0.99)
<i>ZNF746</i>	<b>2.33 (0.96-4.60)</b>	<b>2.46 (0.66-5.01)</b>	1.07 (0.33-1.64)

Примечание: \*Me – медиана, \*\*25%–75% – 25–75 процентиля, жирным выделены статистически значимые результаты ( $p < 0,05$ ).

спечения MS Excel 2007 (Microsoft). Для оценки относительных уровней экспрессии генов применяли непараметрический U-тест Манна-Уитни.

Результаты экспрессионного анализа приведены в таблице 5.

По итогам анализа было выявлено статистически значимое изменение экспрессии генов *ATP13A2*, *PARK7*, *PINK1*, *SNCA* и *ZNF746* по сравнению с общим контролем (здоровые лица). Для генов *ATP13A2*, *PARK7* и *ZNF746* уровни экспрессии специфично изменяются у пациентов с БП и не изменяются в группе неврологического контроля.

Отдельного внимания и комментариев заслуживает повышение уровня экспрессии гена *ZNF746* в группе пациентов без лечения. *ZNF746* активно экспрессируется в стриатуме и черной субстанции [12]. Продукт этого гена, белок PARIS, подвергается убиквитинированию паркином, а также является транскрипционным репрессором PGC-1 $\alpha$ , транскрипционного коактиватора пероксисомального рецептора, вовлеченного в активацию митохондриального биогенеза (рис. 3).

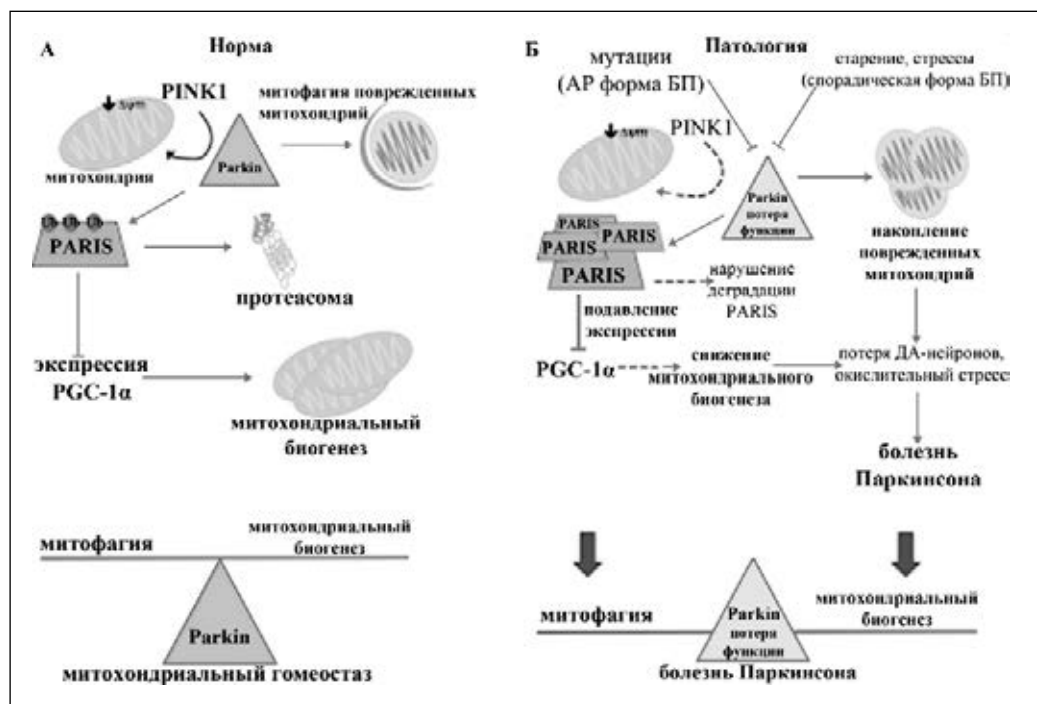


Рисунок 3. Функционирование белка PARIS в клетке.

Дегградация PARIS через паркин инициирует экспрессию PGC-1 $\alpha$  и последующий митохондриальный биогенез [4]. Таким образом, повышенный уровень экспрессии данного гена может влиять на подавление митохондриального биогенеза посредством ингибирования PGC1-а, а также свидетельствовать о недостатке паркина. Кроме того, выявленные различия могут указывать на процессы, происходящие в клетках в ответ на окислительный стресс и накопление неразрушенных белков из-за недостатка паркина.

Полученные нами данные позволяют также надеяться, что в дальнейшем при расширении панели анализируемых генов, нам удастся разработать панели РНК-биомаркеров для ранней и доклинической диагностики БП, так как первые три кандидатных гена (*ATP13A2*, *PARK7* и *ZNF746*) нами уже определены.

#### Литература

1. Applied Biosystems User Bulletin 2001; 2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System.
2. Barbanti P., Fabbri G., Ricci A. et al. Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 1999; 764-771.
3. Buttarelli F.R., Capriotti G., Pellicano C. et al. Central and peripheral dopamine transporter reduction in Parkinson's disease. *Neurol Res.* 2009; 7: 687-691.
4. Castillo-Quan J.I. Parkin' control: regulation of PGC-1 $\alpha$  through PARIS in Parkinson's disease. *Dis. Model Mech.* 2011; 4: 427-429.
5. Coppede F. Genetics and epigenetics of Parkinson's disease. *Scient. World J.* 2012; 489830.
6. Goetz C.G., Poewe W., Rascol O. et al. Movement Disorder Society Task Force Report on the Hoehn and Yahr Staging Scale: Status and Recommendations. *Mov. Disord.* 2004; 9: 1020-1028.
7. Hawkes C.H., Del Tredici K., Braak H. A timeline for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2009; 2: 79-84.
8. Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L., Lees A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1992; 55: 181-184.
9. Ito T., Suzuki K., Uchida K., Nakayama H. Different susceptibility to 1-methyl-4-phenylpyridium (MPP(+))-induced nigro-striatal dopaminergic cell loss between C57BL/6 and BALB/c mice is not related to the difference of monoamine oxidase-B (MAO-B). *Exp. Toxicol. Pathol.* 2013; 1-2: 153-158.
10. Lesage S., Brice A. Role of mendelian genes in «sporadic» Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2012; 5: S66-70.
11. Pankratz H., Foroud T. Genetics of Parkinson disease. *NeuroRx.* 2004; 20: 235-242.
12. Shin J.H., Ko H.S., Kang H. et al. PARIS (ZNF746) repression of PGC-1 $\alpha$  contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell.* 2011; 5: 689-702.
13. Trinh J., Farrer M. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* 2013; 8: 445-454.
14. Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A. et al. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice. *Neuroscience.* 2011; 181: 175-188.

# Мутационный скрининг гена *GBA* с анализом клинических фенотипов болезни Паркинсона, ассоциированных с мутациями

*Н.Ю. Абрамычева, Е.Ю. Федотова, М.С. Степанова, С.Н. Иллариошкин*  
*Научный центр неврологии РАМН (Москва)*

До настоящего времени не до конца установлены точная молекулярная структура наследственных форм болезни Паркинсона (БП) и удельный вес мутаций конкретных генов в различных популяциях мира. По результатам многочисленных работ последних лет частота встречаемости мутаций в гене *GBA* при БП наиболее высокая среди всех генов паркинсонизма [1]. Ген *GBA* при своем повреждении в гомозиготе приводит к недостаточности лизосомного фермента глюкоцереброзидазы, вызывая развитие аутосомно-рецессивной формы лизосомной болезни накопления – болезни Гоше, тогда как гетерозиготные мутации *GBA* являются доказанным фактором риска развития БП и болезни диффузных телец Леви [2,3].

Ген *GBA* картирован на хромосоме 1q21-22 и достаточно дистанцирован от трех известных генетических локусов БП на этой же хромосоме 1p32-36.5; он состоит из 11 экзонов. В настоящее время известно более 300 мутаций в гене *GBA*, большинство из них находятся в области экзонов 8–11, только половина из них генетически значима для случаев болезни Гоше [4]. Скрининг гена у больных с БП в разных популяциях показал значительную неоднородность и различную частоту встречаемости мутаций: от 2,9% до 12%, а среди евреев Ашкенази – от 10% до 31% [5, 6].

Наиболее часто среди всех этнических групп встречаются миссенс-мутации: N370S («мягкая» мутация, которая приводит к незначительному уменьшению β-глюкоцереброзидазной активности) и L444P («тяжелая» мутация, в разы увеличивающая риск развития БП). Большое внимание в последние три года уделяется мутации E326K: при болезни Гоше она не встречается, у пациентов с БП она редка в азиатских, еврейской и португальской популяциях, [7, 8], но для некоторых европейских популяций показана значимая ассоциация E326K с БП [9], а для британской популяции эта мутация рассматривается как доминирующая [11].

## Пациенты и методы исследования

Обследованы 424 пациента, страдающих спорадической и семейной формами БП (мужчин – 196, женщин – 228) в возрасте  $57 \pm 11$  лет. Группа контроля состояла из 397 клинически здоровых лиц. Образцы крови были взяты с информированного согласия исследуемых лиц. У 192 пациентов с БП и 197 лиц контрольной группы был проведен мутационный скрининг всех 11 экзонов гена *GBA*. Остальные 232 образца ДНК пациентов с БП и 200 контрольных генотипированы только по двум мажорным мутациям в *GBA* гене – N370S и L444P.

Образцы геномной ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора для выделения Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega USA).

Анализ кодирующей области *GBA* включал секвенирование всех 11 экзонов с внутренних праймеров, фланкирующих изучаемый экзон с прилегающей интронной областью (не менее 50 пар нуклеотидов с каждого конца). Анализ нуклеотидных последовательностей проводили на капиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems») с помощью программного обеспечения Data Collection Software версии v3.0, Sequencing Analysis Software версии v5.2 и SeqScape Software версии v2.5. Результаты секвенирования были сопоставлены с референсной нуклеотидной последовательностью NCBI, NT\_004487.19. Для оценки значимости найденных вновь мутаций использовались программы SIFT и PolyPhen2. Поиск мажорной мутации N370S в гене *GBA* проводили методом ПЦР в режиме реального времени на анализаторе «АНК-32» («Синтол»), мутации L444P – методом сайт-специфичного рестрикционного анализа.

Наличие всех идентифицированных мутаций подтверждалось методом прямого секвенирования.

## Результаты

Проведенный поиск двух мажорных мутаций в гене *GBA* (N370S и L444P) выявил 18/424 (4,3%) случаев носительства в группе больных с БП и 2/397 (0,5%) в группе контроля (OR=8,59, 95% CI 1,99–37,13; P=0,0006), что соответствует частоте встречаемости этих мутаций в других популяциях. Мутация N370S была установлена у 10/424

(2,4%) пациентов с БП (в четырех случаях с семейной формой и в шести – со спорадической), и в одном случае в контрольной группе (OR=9,5, 95% CI 1,21–74,09; P = 0,01). Вторая, наиболее часто встречающаяся, мутация L444P была выявлена в 8 случаях БП (один случай семейной формы и семь – спорадических) и в одном случае в контрольной группе, частота встречаемости составила 1,9% (OR = 7,6, 95% CI 0,94–60,67; P = 0,02).

Секвенирование всех 11 экзонов *GBA* гена на 192 образцах ДНК пациентов с БП позволило выявить дополнительно еще шесть мутаций. Две из них: E326K и T369M, упоминаются в литературе как непатогенные полиморфизмы для пациентов с болезнью Гоше, но значимо ассоциированы с БП [10]. Встречаемость мутации T369M у пациентов с БП составила 6,8% (13/192) и 1,5% (3/197) в контрольной группе (OR=3,69, 95% CI 1,2–11,31; P=0,01). Частота встречаемости мутации E326K была в два раза выше для пациентов с БП по сравнению с контрольной группой. Описаны случаи, когда мутация E326K в комбинации с другой патогенной мутацией *GBA*, значительно усугубляла течение заболевания.

Ещё четыре варианта выявленных нами мутаций встречались в нашей выборке пациентов с БП только один раз и не были идентифицированы в контроле. Две из них (E388K, R496H) ранее были описаны у пациентов с БП в других популяциях, две другие (L94V, G(-12)X) найдены нами впервые и локализованы за пределами экзона 8–11, в которых находится большинство известных мутаций. Программами SIFT и PolyPhen2 мутация L94V была оценена как толерантная, а G(-12)X – как повреждающая.

Суммарная частота встречаемости мутаций в гене *GBA* у российских пациентов с БП составила 18% (5% для контрольной группы). Результаты представлены в табл.1.

**Таблица 1. Выявленные мутации в гене GBA.**

GBA мутации	Экзон	Пациенты, n (%)	Контроль, n (%)	P	Относительный риск	95% доверительный интервал
L444P	10	8 (1,9%)	1 (0,25%)	0,02	7,6	0,94–60,67
N370S	9	10 (2,4%)	1 (0,25%)	0,01	9,5	1,21–74,09
L444P+N370S		18 (4,3%)	2 (0,5%)	0,0006	8,59	1,99–37,13
E326K	8	9 (4,7%)	5 (2,5%)	0,26	1,87	0,62–5,62
T369M	8	13 (6,8%)	3 (1,5%)	0,01	3,69	1,2–11,31
E388K	9	1 (0,5%)	0			
R496H	11	1 (0,5%)	0			
G(-12)X <sup>a</sup>	2	1 (0,5%)	0			
L94V <sup>a</sup>	4	1 (0,5%)	0			
		Σ 17,8%	Σ 5%			

Примечание: а – ранее не описанные мутации. Для разных мутаций число обследованных лиц различное (см. в тексте).

Сравнительный анализ двух групп пациентов – с найденными мутациями в гене *GBA* и без них не выявил заметных отличий. Обе группы не отличались друг от друга по основным демографическим характеристикам. Так соотношение мужчин и женщин составило в группе с мутациями 48% и 52%, в группе без мутаций – 43% и 57%. Возраст на момент осмотра также статистически значимо не различался: 58±9,7 лет в группе с мутациями и 56,7±11,6 лет в группе сравнения. Группы не различались по основным клиническим характеристикам (средний возраст начала заболевания, стадия по шкале Хен–Яра, наличие семейного анамнеза и т.д.).

Проведенное сравнение фенотипов у носителей различных мутаций в гене *GBA* (N370S, L444P, E326K и T369M) выявило некоторые особенности в каждой из групп (таблица 2). По возрасту начала заболевания отмечалась тенденция к более раннему началу БП в группе с мутацией L444P и к более позднему – у носителей мутации T369M, хотя различие статистически не значимо. Семейные случаи заболевания наблюдались с большей частотой в группе с мутацией E326K. В группе L444P чаще встречалась акинетико-ригидная форма с гипокинезией в виде первого симптома, тогда как в группе T369M – дрожательная форма с дрожательным гиперкинезом руки или ноги в качестве первой жалобы (p=0,017, критерий хи-квадрат). С полученными различиями согласуется и распределение по темпу прогрессирования заболевания: у пациентов с мутацией T369M чаще наблюдалось медленное прогрессирование, которое обычно характерно для дрожательной формы БП. По тяжести заболевания группы статистически значимо не отличались.

Таблица 2. Сопоставление фенотипов БП у носителей различных мутаций в гене *GBA*.

Мутация	N370S	L444P	E326K <sup>#</sup>	T369M
Число пациентов	10	8	9	13
Пол, м/ж	6/4	3/5	4/5	7/6
Возраст, лет	59 ± 8	52 ± 9	58 ± 9	58 ± 12
Возраст начала БП, лет	53 ± 9	46 ± 8	46 ± 13	53 ± 13
Раннее начало, %	50%	50%	44%	38%
Семейные случаи, %	40%	13%	44%	31%
Форма БП: акинетико-ригидная/ смешанная /дрожательная (акинетико-ригидная, %)	2/8/0 (20%)	3/5/0 (38%)*	1/6/2 (11%)	0/13/0 (0%)*
Первый симптом БП: гипокинезия/тремор (гипокинезия %)	4/6 (40%)	5/3 (63%)	5/4 (56%)	4/9 (31%)
Прогрессирование: медленное/ умеренное/быстрое (мед-ленное, %)	2/8/0 (20%)	2/4/2 (25%)	2/6/1 (22%)	5/8/0 (39%)
Стадия по шкале Хен–Яра	2,4 ± 0,6	2,5 ± 1,0	2,9 ± 0,6	2,3 ± 0,7

Примечание: <sup>#</sup>в группу E326K вошли 2 пациента с сочетанием мутаций – L444P/E326K и T369M/E326K; они же были включены в соответствующие группы L444P и T369M. \**p*=0,017.

В группе БП с мутацией N370S был выявлен один случай гомозиготного носительства данного варианта *GBA*, однако по клиническим характеристикам пациент не отличался от классической БП: начало в 59 лет с замедленности движений в правой руке и изменения походки, в семье случаев БП не наблюдалось, а при транскраниальной сонографии была обнаружена гиперэхогенность черной субстанции. У одного из носителей мутации N370S было выявлено также носительство мутации G2019S в гене *LRRK2*; клиническая картина заболевания включала дебют в 47 лет, развитие смешанной формы паркинсонизма с умеренным темпом прогрессирования, а также отягощенный семейный анамнез (мать больного страдала БП).

В группу с выявленными мутациями вошли два случая, у которых были обнаружены по 2 мутации в гене *GBA*. Первый случай – компунд-гетерозиготное носительство мутаций L444P и E326K (у двоих детей пациентки выявлено носительство только L444P). Клиническая картина характеризовалась началом в 39 лет, достаточно быстрым развитием заболевания с изменения походки и общей скованности, с последующим присоединением дрожания (D<S), появлением моторных флюктуаций и выраженных лекарственных дискинезий даже на минимальных дозах леводопа-содержащих препаратов, развитием признаков вегетативной недостаточности, галлюцинаций и умеренных когнитивных нарушений. Спустя 15 лет от начала заболевания имела место тяжелая инвалидизация (на настоящий момент больная сама себя не обслуживает, нуждается в постоянном уходе). Второй случай – выявлено сочетанное носительство мутаций E326K и T369M. Наблюдалось достаточно типичное развитие заболевания с началом в 57 лет (возраст на момент осмотра 60 лет) с неловкости и, позднее, дрожания в правой ноге и руке, с умеренным темпом прогрессирования, хорошим ответом на леводопа-терапию и отягощенным семейным анамнезом: из 5 sibсов у одной сестры наблюдалось дрожание руки, у другой сестры – дрожание руки и головы.

У одного из носителей мутации E326K наблюдалась трансформация клинической картины заболевания – из эссенциального тремора в БП. У этой пациентки 59 лет болезнь манифестировала в возрасте 20 лет с дрожания обеих рук, фенотипически она расценивалась как эссенциальный тремор, однако в последние 3 года появились односторонняя гипокинезия и ригидность, гиперэхогенность черной субстанции не обнаружена. Дрожание рук отмечалось также у дочери пациентки, у которой было выявлено носительство той же мутации.

Нами также был выявлен один случай гомозиготного носительства мутации T369M, но клиническая картина при этом не отличалась от классической БП (дебют в 57 лет, постепенное развитие смешанной формы БП, без отягощенного семейного анамнеза).

У пациентки с мутацией R496H, 70 лет, на протяжении последних 30 лет наблюдалось медленное развитие клинической картины эссенциального тремора с постурально-кинетическим тремором рук и ног; в последние 5 лет присоединились умеренный тремор покоя в руках и ногах и общая гипокинезия с акцентом слева. При транскраниальной сонографии гиперэхогенность слева не превышала порогового значения (13 мм<sup>2</sup>). Семейный анамнез не отягощен. Учитывая асимметричное развитие гипокинезии и присоединение тремора покоя, клинической картина была расценена как переходная форма – трансформация эссенциального тремора в БП.

У носителей мутаций E388K, G(-12)X и L94V каких-либо особенностей клинической картины выявлено не было, семейный анамнез отрицательный.



## Обсуждение

Частота встречаемости мутаций в гене *GBA* у больных с БП в российской популяции оказалась выше, чем в других генах паркинсонизма, что характерно также и для других изученных популяций. Мажорные мутации N370S и L444P в нашей выборке больных с БП встречались с частотой 4,3%, а в контрольной группе — 0,5%. Так же как в некоторых европейских популяциях, высокую ассоциацию с БП показали мутации E326K и T369M: 11,5% у больных БП и 4% в контрольной группе. В основном найденные мутации располагались в экзонах 8–11, однако две новые мутации, выявленные нами вне этой области, подтверждают необходимость секвенировать ген полностью.

Клинико-генетические сопоставления показали, что при разных мутациях *GBA* могут быть свои фенотипические особенности, которые зависят, по-видимому, от тяжести мутации: например, при одних мутациях (L444P) отмечается более тяжелое течение, при других (T369M) — более мягкое по сравнению с остальными. При сочетании нескольких мутаций в гене *GBA* клиническая картина так же зависит от патогенности мутаций. Так, в случае гомозиготного носительства «мягких» мутаций (T369M, N370S) и их сочетания (E326K+T369M) клиническая картина не имеет каких-либо особенностей и похожа на типичную спорадическую БП, а при сочетании «тяжелой» мутации (L444P) с «мягкой» (E326K) может наблюдаться достаточно быстрое прогрессирование заболевания с ранним началом и развитием лекарственных осложнений (аддитивный модифицирующий эффект). При этом сочетание мутаций в разных паркинсонических генах может не приводить к появлению каких-то дополнительных особенностей, как было показано на примере аутосомно-доминантной формы *LRRK2*-ассоциированного паркинсонизма в сочетании с «мягкой» мутацией в гене *GBA* (N370S).

Интересно отметить, что в двух случаях (больные с мутациями R496H и E326K) наблюдался фенотип ЭТ, предшествующий переходу в БП. Нельзя исключить, что среди пациентов с синдромом «ЭТ–БП» возможна большая частота встречаемости мутаций в гене *GBA*, что заслуживает дальнейшего изучения

Отличие от встречающихся в литературе наблюдений, указывающих на повышенный риск развития деменции у пациентов с БП — носителей мутаций *GBA* [12], в нашем исследовании из всех 42 пациентов с выявленными мутациями когнитивное снижение, которое могло бы быть расценено на момент осмотра как деменция (по DSM-IV), наблюдалось лишь в небольшом числе случаев — 9,5% (2 случая с L444P, один — с T369M и один — с L94V).

Проведенный нами мутационный скрининг больных с БП российской популяции с применением полного секвенирования кодирующей области гена *GBA* показал высокую значимость этого гена как фактора риска развития БП.

## Литература

1. Lwin A., Orvisky E., Goker-Alpan O. et al. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol. Genet. Metab.* 2004; 81: 70-73.
2. Sidransky E., Lopez G. The link between the *GBA* gene and parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2012; 11: 986-998.
3. Swan M., Saunders-Pullman R. The association between  $\alpha$ -glucocerebrosidase mutations and parkinsonism. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2013; 13: 368.
4. Hruska K.S., LaMarea M.E., Scott C.R., Sidransky E. Gaucher disease: Mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (*GBA*). *Hum. Mutat.* 2008; 29: 567-583.
5. Liu J., Zhang H-X. Significant study of population stratification, sensitivity analysis and trim and fill analyses on *GBA* mutation and Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genet.* 2013; 165B: 96-102.
6. Winder-Rhodes S.E., Evans J.R., Ban M. et al. Glucocerebrosidase mutations influence the natural history of Parkinson's disease in a community-based incident cohort. *Brain* 2013; 136: 392-399.
7. Mitsui J., Mizuta I., Toyoda A. et al. Mutations for Gaucher disease confer high susceptibility to Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 2009; 66: 571-576.
8. Bras J., Paisan-Ruiz C., Guerreiro R. et al. Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Portugal. *Neurobiol. Aging* 2009; 30: 1515-1517.
9. Pankratz N., Beecham G.W., DeStefano A.L. et al. Meta-analysis of Parkinson's disease identification of a novel locus, RIT2. *Ann. Neurol.* 2012; 71: 370-384.
10. Duran R., Mencacci N.E., Angeli A.V. et al. The Glucocerebrosidase E326K variant predisposes to Parkinson's disease, but does not cause Gaucher's disease. *Mov. Disord.* 2013; 28: 232-236.
11. Horowitz M., Pasmanik-Chor M., Ron I., Kolodny E.H. The enigma of the E326K mutation in  $\alpha$ -glucocerebrosidase. *Mol. Genet. Metab.* 2011; 104: 35-38.
12. Setor-Salvia N., Pagonabarraga J., Houlden H. et al. Glucocerebrosidase mutations confer a greater risk of dementia during Parkinson's disease course. *Mov. Disord.* 2012; 27: 393-399.

# Ген *C9ORF72* в развитии нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся расстройствами движений

*Е.Ю. Федотова, Н.Ю. Абрамычева, М.С. Степанова, Е.В. Лысогорская, С.Н. Иллариошкин*  
*Научный центр неврологии РАМН (Москва)*

Ген *C9ORF72* (*chromosome 9 open reading frame*), открытый в 2011 г. и располагающийся на коротком плече 9-й хромосомы, наиболее значим в структуре определенного спектра заболеваний – бокового амиотрофического склероза (БАС) и лобно-височной деменции (ЛВД) и др. [9]. Указанные заболевания имеют определенное сходство патогенетических механизмов – так, например, известны случаи «смешанных» фенотипов ЛВД–БАС. Клиническая картина БАС представлена симптомами поражения нижнего мотонейрона (слабость, атрофии, крампи, фасцикуляции) в сочетании с признаками вовлечения кортикоспинального тракта (спастичность, повышение и наличие патологических рефлексов) и, в некоторых случаях, кортикобульбарного пути [2]. ЛВД проявляется расстройством личности и поведения с расторможенностью и/или апатико-абулическим синдромом и характеризуется избирательной асимметричной дегенерацией коры лобной и передних отделов височных долей [1].

Основной мутацией в гене *C9ORF72* является экспансия гексануклеотидных повторов GGGGCC, которая располагается в первом интроне. Экспансия считается патологической при числе копий гексануклеотидных повторов выше 30. Данная мутация распространена в европейской популяции с наибольшей частотой встречаемости в Финляндии, при этом она достаточно редко встречается в азиатских популяциях. При анализе гаплотипов было высказано предположение об «эффекте основателя»: по мнению ряда авторов, экспансия могла возникнуть около 100 поколений назад в Северной Европе, хотя другие работы это не подтверждают [8].

Частота встречаемости экспансии *C9ORF72* (C9+) среди семейных случаев ЛВД составляет 3–48%, среди семейных случаев БАС – 3–46%; несколько меньше она при спорадической ЛВД – 2–23% и при спорадическом БАС – 0,4–21%, а в случаях сочетания ЛВД и БАС – 10–88% [20, 25].

Наиболее часто в общей популяции встречаются 2, 5 и 8 копий гексануклеотидных повторов в гене *C9ORF72*. Верхняя граница нормального количества повторов до настоящего времени пока точно не установлена, так же как и границы промежуточного количества повторов («серой зоны»). По некоторым данным, в качестве промежуточных могут рассматриваться аллели от 20 до 30 гексануклеотидных повторов, а патологическими – свыше 30. При этом в контрольной группе встречаются случаи с носительством более 30 копий повторов, но никогда – более 100. Бесспорно патологической считается экспансия от 400 до > 4400 гексануклеотидных повторов [25].

Обсуждаются три возможных взаимодополняющих молекулярных механизма, через которые реализуется патологическое действие экспансии в гене *C9ORF72*: 1) гаплонедостаточность; 2) образование РНК-фокусов с секвестрацией РНК-связывающих белков; 3) RAN-зависимая трансляция области экспансии, приводящая к образованию белков, состоящих из повторов [3, 19, 28].

**Гаплонедостаточность.** В нескольких исследованиях показано, что у пациентов с БАС и ЛВД отмечается снижение уровня экспрессии *C9ORF72*. Среди причин, приводящих к данному снижению, называются эпигенетические процессы, такие как триметилирование гистонов при гексануклеотидной экспансии и гиперметилирование CpG-островка, расположенного рядом с экспансией [4, 26]. Кроме этих процессов к снижению экспрессии *C9ORF72* приводит изменение пространственной структуры РНК, состоящей из многочисленных гGGGCC-повторов. РНК в этих случаях образует стабильную G-квадриплексную структуры (из четырех G), нарушающую сплайсинг и трансляцию [12]. При исследованиях, проводимых на *C. elegans* и рыбках данио, была подтверждена патогенетическая роль гаплонедостаточности: потеря функции *C9ORF72* вызывает у этих видов дегенерацию мотонейронов [5].

Предполагается, что белок, кодируемый геном *C9ORF72*, участвует в эндолизосомальных процессах деградации, так как этот белок структурно сходен с семейством белков DENN (Differentially Expressed in Normal and Neoplasia) [17]. Белки этого семейства важны для мембранного транспорта, следовательно, недостаточность белка *C9ORF72* может приводить к нарушению мембранного транспорта, процессов аутофагии и лизосомального пути деградации белков [10]. Накопление белков, меченных убиквитином, подтверждается характерной C9+-патоморфологической картиной с формированием внутриклеточных убиквитин- и p62-позитивных включений, которые обнаруживаются в неокортексе, гиппокампе, мозжечке [21].

Однако, в литературе присутствуют описания нескольких случаев гомозиготного носительства экспансии, которые клинически не отличаются от гетерозиготных носителей мутации, что говорит о том, что гаплонедостаточность является не единственным патогенетическим механизмом C9+-патологии [11].

**Формирование РНК-фокусов с секвестрацией РНК-связывающих белков.** Патологическая экспансия GGGGCC приводит не только к снижению экспрессии белка C9ORF72, но и к появлению токсических свойств соответствующей РНК. При этой мутации смысловые и антисмысловые РНК с многочисленными повторами образуют вместе с РНК-связывающими белками и факторами сплайсинга в ядрах нейронов РНК-фокусы (или включения). Подобная аккумуляция наблюдается и при других нейродегенеративных заболеваниях: при нескольких спиноцеребеллярных атаксиях и при синдроме тремор/атаксия, связанном с X-ломкой хромосомой (FXTAS), патогенез этих заболеваний также связан с экспансиями повторов [14, 29].

Одним из главных РНК-связывающих белков, который секвестрируется при C9+-патологии, является TDP-43. Данный белок участвует в регуляции метаболизма ДНК и РНК. Секвестрация его в РНК-фокусы приводит к системному нарушению различных ядерных и цитозольных процессов. Кроме TDP-43 в РНК-фокусы рекрутируется также ряд других белков, участвующих в РНК-метаболизме, что приводит к значительным нарушениям клеточного функционирования [15].

**RAN-зависимая трансляция экспансии.** RAN-зависимая трансляция (от англ.: *Repeat-Associated Non-ATG* – ассоциированная с повтором, не связанная с ATG) была впервые обнаружена при изучении спиноцеребеллярной атаксии 8 типа – заболевания, связанного с экспансией CTG\*CAG-повторов. При этой экспансии удаление иницирующего трансляцию кодона ATG не предотвращало синтез полиглутаминового белка, и кроме этого белка с ATG-ориентированной рамкой считывания обнаруживались еще два белка со смещенными рамками считывания – полиаланиновый и полисериновый белки. В дальнейшем механизмы RAN-трансляции были показаны для миотонической дистрофии и синдрома FXTAS [6].

В случае экспансии гексануклеотидных повторов в гене C9ORF72 также была обнаружена RAN-зависимая трансляция со смысловой и антисмысловой цепей ДНК. Со смысловой цепи (GGGGCC)<sub>n</sub> синтезируются три белка в зависимости от рамки считывания: поли-Гли-Арг, поли-Гли-Про и поли-Гли-Ала. С антисмысловой цепи (CCCCGG)<sub>n</sub> синтезируются – поли-Про-Ала, поли-Про-Гли (идентичный поли-Гли-Про) и поли-Про-Арг. Образованные пептиды формируют внутри клетки нерастворимые агрегаты, однако считается, что данные скопления выполняют скорее протективную функцию, тогда как растворимые формы этих белков возможно обладают токсическими свойствами [29].

Как уже было сказано, перечисленные патогенетические механизмы приводят к развитию определенного фенотипического спектра «БАС-ЛВД». Показано, что появление той или иной клинической картины не связано с количественными характеристиками мутации, однако большее число копий повторов может коррелировать парадоксальным образом с более поздним возрастом начала заболевания. C9+-ЛВД представлена преимущественно поведенческим вариантом заболевания, часто сочетающимся с психиатрическими проявлениями и с «амнестическим» профилем при нейропсихологическом обследовании [23]. Для случаев C9+-БАС обычно характерна классическая клиническая картина заболевания, но возможны большая частота встречаемости бульбарных форм [8]. Однако, считается, что по клинической картине достаточно сложно заподозрить наличие C9+-патологии. Одними из основных отличительных особенностей C9+-патологии можно считать дополнение одного заболевания признаками другого (например, появление нейропсихологических нарушений у пациентов с БАС или признаков болезни двигательного нейрона у пациентов с ЛВД) и положительный семейный анамнез со случаями БАС и/или ЛВД среди родственников [8, 25].

Кроме БАС и ЛВД описаны случаи встречаемости патологической экспансии при других заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, синдром паркинсонизма, оливопонтocereбеллярная дегенерация, кортикобазальный синдром и фенокопии болезни Гентингтона [20, 28].

Для определения распространенности экспансии в гене C9ORF72 в общей российской популяции и при ряде нейродегенеративных заболеваний были сформированы и обследованы 4 группы: пациенты с боковым амиотрофическим склерозом (n=237), пациенты с болезнью Паркинсона (n=175), пациенты с атипичным паркинсонизмом (n=54) и контрольная группа (n=223). В группу с атипичным паркинсонизмом вошли пациенты с мульти-системной атрофией, прогрессирующий надъядерным параличом, кортикобазальным синдромом и деменцией с тельцами Леви.

Для выявления экспансии образцы геномной ДНК выделяли из цельной крови с помощью набора для выделения Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). Скрининг экспансии GGGGCC-повторов в гене C9ORF72 проводили в два этапа. Сначала методом анализа длин фрагментов на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 с помощью программного обеспечения GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems) анализировали ампликоны, содержащие область гексануклеотидных повторов. На втором этапе для всех образцов ДНК, идентифицированных как гомозиготные, применили метод ПЦР с использованием праймера, специфичного к повтарам (RP-PCR,

“Repeat-primed” PCR), так как именно в этих образцах предполагалось носительство большого количества повторов, которое не было идентифицировано на первом этапе фрагментного анализа [9, 24].

Из всех групп были выявлены 10 образцов, которые на первом этапе были отмечены как гомозиготные, с числом повторов от 2 до 16. Для установления точного количества повторов эти образцы были исследованы методом RT-PCR, по результатам которого подтверждено носительство патологической экспансии повторов в гене *C9ORF72*.

По результатам исследования оказалось, что в контрольной группе (как и по литературным данным) наиболее часто встречаются аллели с 2, 5 и 8 копиями гексануклеотидных повторов. Процентное распределение обследованных из контрольной группы по длине большего нормального аллеля представлено на рисунке. Схожий профиль распределения по длине нормальных аллелей (до 17 повторов) был получен и для трех групп пациентов (таблица).

Как видно из таблицы, в группе БАС были обнаружены 6 пациентов с 42–61 копиями гексануклеотидных повторов, таким образом частота встречаемости патологической экспансии (>30 повторов) при БАС составила 2,5%. В этой группе встречались семейные (18 пациентов из 17 неродственных семей) и спорадические случаи заболевания (219 пациентов без отягощенного семейного анамнеза). Встречаемость экспансии среди семейных случаев БАС составила 1/17=5,9%, среди спорадических – 5/219=2,3%. Стоит отметить, что у единственного носителя экспансии с отягощенным семейным анамнезом клиническая картина БАС наблюдалась у брата и у тети (сестры матери), а у отца в течение последних лет жизни – явления деменции.

В группе БП у 4 пациентов обнаружена «промежуточная» экспансия гексануклеотидных повторов (19–20 повторов), частота ее встречаемости при БП составила 4/175=2,3%. При этом, так же как и в других исследованиях, нами не было обнаружено ни одного случая БП с «полной» патологической экспансией [7, 13, 16, 18, 27]. Значимость «промежуточного» числа копий повторов для развития БП была описана в одной из недавно опубликованных работ [22], и нами получены аналогичные результаты. Клинически пациенты с «промежуточной» экспансией существенно не отличались от классической картины БП, кроме одной пациентки с ранним началом заболевания и дистоническими проявлениями.

При атипичном паркинсонизме несмотря на то, что описаны единичные случаи встречаемости мутации в литературе, в нашей выборке не было выявлено ни одного больного с носительством экспансии. Возможно, это связано с относительно небольшим числом больных в группе.

Таким образом, в работе была подтверждена значимость патологической экспансии гексануклеотидных повторов в гене *C9ORF72* для развития БАС и значимость «промежуточной» экспансии в данном гене для манифестации БП.

**Благодарность:** исследование поддержано грантом РФФИ (№ 13-04-01718).

#### Литература

1. Левин О.С. Диагностика и лечение деменции в клинической практике. М.: МЕДпресс-информ, 2010.
2. Боковой амиотрофический склероз (под ред. И.А.Завалишина). М.: Евразия+, 2007.
3. Almeida S., Gascon E., Tran H. Modeling key pathological features of frontotemporal dementia with C9ORF72 repeat expansion in iPSC-derived human neurons. *Acta Neuropathol.* 2013; 126: 385-399.
4. Belzin V.V., Bauer P.O., Prudencio M. Reduced C9orf72 gene expression in c9FTD/ALS is caused by histone trimethylation, an epigenetic event detectable in blood. *Acta Neuropathol.* 2013; 126: 895-905.
5. Ciura S., Lattante S., Le Ber I. Loss of function of C9orf72 causes motor deficits in zebrafish model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 2013; 74: 180-187.
6. Cleary J.D., Ranum L.P.W. Repeat-associated non-ATG (RAN) translation in neurological disease. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22 (R1): R45-R51.
7. Cooper-Knock J., Frolov A., Heighley J.R. C9ORF72 expansions, parkinsonism, and Parkinson disease. *Neurology* 2013; 81: 808-811.
8. Cooper-Knock J., Shaw P.J., Kirby J. The widening spectrum of C9orf72-related disease; genotype/phenotype correlations and potential modifiers of clinical phenotype. *Acta Neuropathol.* 2014; 127: 333-345.
9. DeJesus-Hernandez M., Mackenzie I.R., Boeve B.F. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in non-coding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 2011; 72: 245-256.
10. Farg M.A., Sundaramoorthy V., Sultana J.M. C9ORF72, implicated in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia, regulates endosomal trafficking. *Hum Mol. Genet.* 2014; 23: 3579-3595.
11. Fratta P., Poulter M., Lashley T. Homozygosity for the C9orf72 GGGGCC repeat expansion in frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol.* 2013; 126: 401-409.
12. Haeusler A.R., Donnelly C.J., Periz G. C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature* 2014; 507: 195-200.
13. Harms M.B., Neumann D., Benitez B.A. Parkinson disease is not associated with C9ORF72 repeat expansions. *Neurol. Aging* 2013; 34: 1519.e1-1519.e2.
14. Heutink P., Jansen I.E., Lynes E.M. C9orf72; abnormal RNA expression is the key. *Exp. Neurol.* 2014; doi: 10.1016/j.expneurol.2014.05.020.
15. Janssens J., van Broeckhoven C. Pathological mechanisms underlying TDP-43 driven neurodegeneration in FTLD-ALS spectrum disorders. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22 (R1): R77-R87.
16. Lesage S., Le Ber I., Condroyer C. C9orf72 repeat expansions are a rare genetic cause of parkinsonism. *Brain* 2013; 136: 385-391.
17. Levin T.P., Daniels R.D., Gatta A.T. The product of C9orf72, a gene strongly implicated in neurodegeneration, is structurally related to DENN Rab-GEFs. *Bioinformatics* 2013; 29: 499-503.
18. Lin C.-H., Chen T.-F., Chiu M.J. Lack of C9orf72 repeat expansion in Taiwanese patients with mixed neurodegenerative disorders. *Front Neurol.* 2014; 5: 59.
19. Ling S.C., Polymenidou M., Cleveland D.W. Converging mechanisms in ALS and FTD: disrupted RNA and protein homeostasis. *Neuron* 2013; 79: 416-438.
20. Liu Y., Yu J.-T., Zong Y. C9orf72 mutations in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.* 2014; 49: 386-398.
21. Mackenzie I.R.A., Frick P., Neumann M. The neuropathology associated with repeat expansions in the C9orf72 gene. *Acta Neuropathol.* 2014; 127: 347-357.
22. Nuytemans K., Bademci G., Kohli M.M. C9orf72 intermediate repeat copies are a significant risk factor for Parkinson disease. *Ann. Hum. Genet.* 2013; 77: 351-363.
23. van Langenhove T., van der Zee J., Gijssels I. Distinct clinical characteristics of C9orf72 expansion carriers compared with GRN, MAPT, and nonmutation carriers in a Flanders-Belgian FTLD cohort. *JAMA Neurol.* 2013; 70: 365-373.
24. Warner J.P., Barron L.H., Goudie D. A general method for the detection of large CAG repeat expansions by fluorescent PCR. *J. Med. Genet.* 1996; 33: 1022-1026.
25. Woolacott I.O.C., Mead S. The C9orf72 expansion mutation: gene structure, phenotypic and diagnostic issues. *Acta Neuropathol.* 2014; 127: 319-332.
26. Xi Z., Zimman L., Moreno D. Hypermethylation of the CpG island near the G4C2 repeat in ALS with a C9orf72 expansion. *Am. J. Hum. Genet.* 2013; 92: 981-989.
27. Yeh T.-H., Lai S.-C., Weng Y.-H. Screening for C9orf72 repeat expansions in parkinsonian syndromes. *Neurobiol. Aging* 2013; 34: 1311.e3-1311.e4.
28. Yokoyama J.S., Sirkis D.W., Miller B.L. C9orf72 hexanucleotide repeats in behavioral and motor neuron disease: clinical heterogeneity and pathological diversity. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 2014; 3: 1-18.
29. Zu T., Liu Y., Banez-Coronel M. RAN protein and RNA foci from antisense transcripts in C9ORF72 ALS and frontotemporal dementia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110: E4968-E4977.



# Экспериментальные аспекты изучения дофаминергических нейронов, полученных из фибробластов кожи человека на основе технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Л.Г. Хаспекоев<sup>1</sup>, А.В. Ставровская<sup>1</sup>, Р.М. Худоерков<sup>1</sup>, Д.Н. Воронков<sup>1</sup>, М.А. Лагарькова<sup>2</sup>, С.Л. Киселев<sup>2</sup>, Е.Ю. Федотова<sup>1</sup>, И.А. Гривенников<sup>3</sup>, И.В. Мухина<sup>4</sup>, С.Н. Иллариошкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Научный центр неврологии РАМН; <sup>2</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова;

<sup>3</sup>Институт молекулярной генетики (Москва); <sup>4</sup>Нижегородская государственная медицинская академия (Нижний Новгород)

Одним из потенциальных подходов к терапии болезни Паркинсона (БП) является восполнение дефицита дофамина с применением клеточной заместительной терапии, осуществляемой путем трансплантации в головной мозг больного зрелых, полноценных по своим морфофункциональным характеристикам дофаминергических нейронов (ДЭН) [10]. Наиболее перспективным для нейротрансплантации представляется использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), получаемых из соматических клеток (например, фибробластов кожи) пациента по технологии, разработанной в 2006–2007 гг. [17, 18], и дифференцированных *in vitro* в зрелые дофаминергические нейроны [6, 7]. Дифференцировка ДЭН из ИПСК имеет принципиальное значение для решения фундаментальных вопросов патогенеза БП, тестирования новых лекарственных препаратов с дофаминергическим и нейропротекторным действием, а также для продукции достаточного количества адекватного клеточного материала с целью нейротрансплантации.

В настоящей работе дана морфогенетическая, иммунохимическая и функциональная характеристика ИПСК, полученных нами из фибробластов кожи здоровых доноров и пациентов с БП и дифференцированных в ДЭН. Кроме того, показана потенциальная возможность коррекции неврологических нарушений при трансплантации этих клеток крысам с экспериментальной моделью паркинсонизма.

## Методы исследования

### 1. Пациенты.

В исследование были включены 3 пациента с генетически обусловленными формами БП. Двое пациентов страдали аутосомно-доминантной формой БП и были гетерозиготными носителями мажорной мутации G2019S в гене *LRRK2* (хромосома 12q12, форма PARK8), а один имел аутосомно-рецессивную форму болезни и был компаунд-гетерозиготным носителем двух мутаций (IVS1+1G/A и делеция 2-го экзона) в гене *PRKN* (паркин, хромосома 6q25.2–27, форма PARK2). Формы PARK2 и PARK8 являются наиболее изученными из всех генетических вариантов первичного паркинсонизма [12]. В качестве контрольных образцов использованы клетки, полученные от двух здоровых доноров.

### 2. Получение образцов кожи (фибробластов) от здоровых добровольцев и пациентов с генетическим паркинсонизмом.

После подписания информированного согласия у доноров под местной новокаиновой блокадой срезали расщепленные лоскуты кожи предплечья толщиной 0,2–0,3 мм и размером 0,5 x 0,5 мм. Эксплантаты сохраняли до 12 часов в среде для выделения фибробластов, содержащей DMEM (ПанЭко или Nyclone, High glucose) с добавлением 15% FBS (Nyclone), 2 mM L-глутамин (Nyclone), пенициллин-стрептомицин (50 ЕД/мл; 50 мкг/мл) (ПанЭко) и хранившейся до 3 месяцев при температуре +8°C.

Далее эксплантаты в капле среды помещали на крышку чашки Петри и разрезали на небольшие фрагменты объемом порядка 0,3–1,5 мм<sup>3</sup>. Для максимально эффективного разрезания эксплантата использовали скальпели с саблевидным лезвием, при этом эксплантат удерживали пинцетом, а скальпелем «катыющимися» движениями со значительным нажимом производили нарезку эксплантата. Фрагменты кожи помещали на чашку Петри и накрывали



вали покровным стеклом. Через 1–2 недели фибробласты мигрировали на поверхность чашки и в дальнейшем культивировались до 2–3 пассажей.

### 3. Получение ИПСК из культивированных фибробластов.

Для получения ИПСК фибробласты высевали на культуральные чашки (Corning, США) диаметром 35 мм, примерно по 40000 клеток на чашку. Через 2 дня клетки инфицировали четырьмя оригинальными лентивирусными векторами (LeGO-hOCT4, LeGO-hSOX2-IRES-GFP, LeGO-hc-Мус, LeGO-hKLF4) в различных количествах и соотношениях. Через 5 дней после инфекции клетки пересевали 1 к 12 на различные подложки: пластик (Corning, США), желатин (Sigma-Aldrich, США), матригель (BD Biosciences, США) и митотически инактивированные мышечные эмбриональные фибробласты в среде для фибробластов. На следующий после посева день среду меняли на среду для культивирования ЭСК в фидерных условиях. Затем клетки культивировали в этой среде в течение 10–12 дней, среду меняли раз в 2 дня. К этому моменту на чашках образовывалось множество клонов с различной морфологией. Эти клоны механически пересевали и культивировали отдельно в условиях культивирования ЭСК. В процессе репрограммирования в среду к клеткам добавляли вальпроевую кислоту (VPA) (Sigma-Aldrich, США) и VIX-01294 (Sigma-Aldrich, США) до концентраций в среде 1 мМ и 2 мкМ, соответственно, в течение второй недели после инфекции.

### 4. Дифференцировка ИПСК в дофаминергические нейроны.

Методика индукции дифференцировки ИПСК в нейроны описана ранее [4]. Идентификацию ДЭН в культуре, дифференцированных из ИПСК, проводили иммуногистохимически [4].

### 5. Оценка функционального состояния нейронов, дифференцированных из ИПСК, при их культивировании на мультиэлектродной матрице.

Перед культивированием на мультиэлектродной матрице [3] ИПСК подвергали воздействию факторов, индуцирующих их дифференцировку в нейроны [4]. В качестве опорного субстрата для клеток использовали комбинация матригель/фибронектин в отношении 100:1. Клетки культивировали в среде NBM (Invitrogen), содержащей B27 (Invitrogen), глутамин (Sigma), 2 нг/мл GDNF и 2 нг/мл BDNF (Sigma). Поддержание жизнеспособности культуры в течение двух недель осуществлялось при температуре 35,5°C в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора, содержащего газовую смесь в составе 95% воздуха и 5% CO<sub>2</sub>, при влажности 100%.

Регистрацию спонтанной биоэлектрической активности клеток проводили в условиях CO<sub>2</sub>-инкубатора в течение первых двух недель культивирования, с использованием системы внеклеточной регистрации сигналов MEA (Multichannel systems, Germany).

### 6. Экспериментальная модель паркинсонизма. Трансплантация дифференцированных ИПСК в мозг крыс с экспериментальным паркинсонизмом.

Использованная в работе модель паркинсонизма основана на введении в область черной субстанции головного мозга крысы нейротоксина 6-гидроксидофамина (6-OHDA), специфически повреждающего дофаминергические нейроны [11].

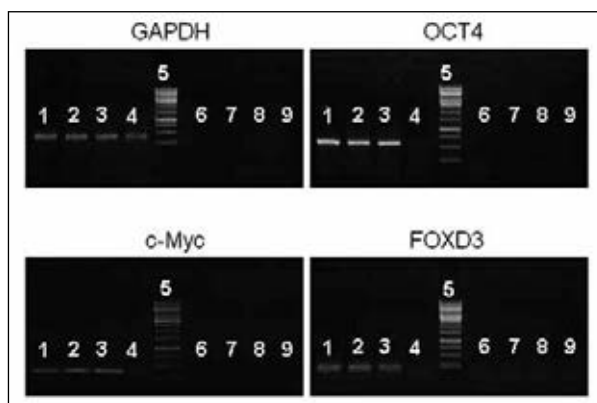
Работа выполнена на четырех крысах-самцах линии Wistar в возрасте 3–4 месяцев. Для получения одностороннего повреждения nigrostriatной области мозга в компактную часть черной субстанции справа стереотаксически вводили 6-OHDA в дозе 8,0 мкг в 4 мкл 0,05% раствора аскорбиновой кислоты со скоростью 0,4 мкл в минуту. Для стереотаксического введения были использованы следующие координаты от брегмы [14]: AP=–4,8; V=1,9; L=8,0. Животные были анестезированы внутривенным введением кетамина 50 мг/кг и бензодиазепина 5 мг/кг.

Спустя 4 недели после введения 6-OHDA крысам на фоне развившегося паркинсонического синдрома (см. далее) были трансплантированы дофаминергические нейроны, дифференцированные из ИПСК, репрограммированных из фибробластов человека (здоровых доноров). Клетки в виде суспензии, в концентрации 1 x 10<sup>6</sup> кл/10 мкл физиологического раствора, трансплантировались в стриатум ипсилатерально нейротоксическому повреждению по следующим координатам [14]: AP = 1,2; V = 2,2; L = 5,0. С целью иммуносупрессии все крысы-реципиенты получали инъекции циклоспорина (15 мг/кг) ежедневно, начиная с двух дней до операции нейротрансплантации, и далее постоянно на протяжении всего послеоперационного периода.

## Результаты

### 1. Морфологическая, генетическая и иммуногистохимическая характеристика ИПСК.

Клоны ИПСК от здоровых доноров и от пациентов с первичным паркинсонизмом по своим морфологическим критериям были сходны друг с другом. К основным признакам сходства мы отнесли компактное расположение клеток внутри колонии и ровные края колоний, примерно одинаковый размер клеток (около 20 мкм) и сходный период удвоения, способность расти в бесфидерных условиях монослойными колониями с плотными контактами между соседними клетками. Необходимо отметить, что культивируемые ИПСК в течение длительного времени оказались способными поддерживать неизменными морфологию и время удвоения, что свидетель-



**Рисунок 1.** Экспрессия маркеров плюрипотентности при исследовании мРНК (обратная транскрипция).

Дорожка 1 – эмбриональные стволовые клетки; дорожки 2, 3 – клоны ИПСК (пациенты); дорожка 4 – исходные фибробласты; дорожка 5 – маркер; дорожки 6–9 – то же без обратной транскрипции.

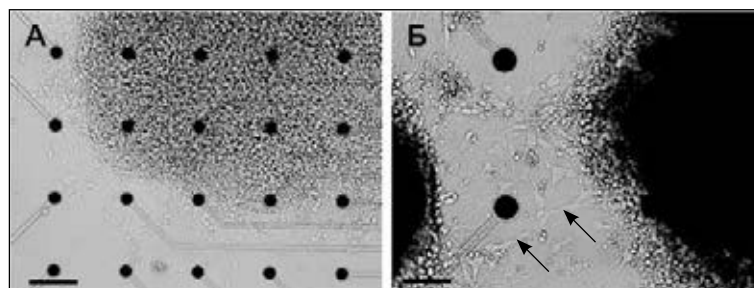
ствует о возможности их длительного культивирования в неизменном виде, а также проводить их наращивание в больших масштабах, необходимое для экспериментов по направленной дифференцировке и по трансплантации этих клеток.

Исследование хромосомного набора клонов ИПСК с использованием стандартного метода G-окраски по Гимза выявило нормальный кариотип, соответствующий полу пациентов-доноров с первичным паркинсонизмом. Молекулярно-генетический анализ показал наличие специфической мРНК анализируемых факторов плюрипотентности в культуре ИПСК (рис. 1). С целью подтверждения репрограммирования фибробластов до плюрипотентного состояния с помощью стандартных методов обратной транскрипции (rt-ПЦР) и иммуноцитохимии ранее нами был проведен анализ экспрессии маркеров, характерных для плюрипотентных клеток: OCT4, SOX2, c-Мус, KLF4, NANOG, FOXD3, HESX1, SALL4, DPPA4, SALL1, SSEA-4. Было обнаружено, что в отобранных клонах экспрессируются гены-маркеры, типичные для плюрипотентного состояния [2]. Кроме того, прямым подтверждением плюрипотентности полученных ИПСК послужила их способность дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков, выявленная нами иммуногистохимически с помощью специфических эпителиального (панцитокератин), мезодермального (десмин) и энтодермального ( $\alpha$ -фетопротеин) маркеров [4].

## 2. Морфофункциональные критерии дифференцировки ИПСК в дофаминергические нейроны.

Полученные из кожных фибробластов ИПСК здоровых доноров и пациентов с первичным паркинсонизмом были дифференцированы в зрелые постмитотические нейроны. Проведенный нами ранее иммуногистохимический анализ показал, что полученные нейроны имеют не только специфические нейрональные маркеры ( $\beta$ -3-тубулин), но и экспрессируют характерный для дофаминергических нейронов фермент тирозингидроксилазу [4]. Следует подчеркнуть, что использованный нами метод дифференцировки позволил получить в дифференцированных культурах ИПСК от всех пациентов не менее 50% специализированных нервных клеток. Эти клетки были дополнительно охарактеризованы по экспрессии некоторых генов плюрипотентности (*Oct4*, *Sox2*, *Nanog*), отсутствие которой явилось доказательством соответствующего эпигенетического статуса полученных нейронов.

Каких-либо различий свойств дофаминергических нейронов, полученных из репрограммированных фибробластов здоровых доноров и пациентов с генетическими формами БП, выявлено не было. В нейронах, полученных



**Рисунок 2.** Культура ИПСК на мультиэлектродной матрице.

А – 3 дня *in vitro*. Б – 7 дней *in vitro*. Живая культура, фазовый контраст. Масштаб 200 мкм (А), 100 мкм (Б). Стрелки указывают на формирующуюся нейритную связь между нейросферами.

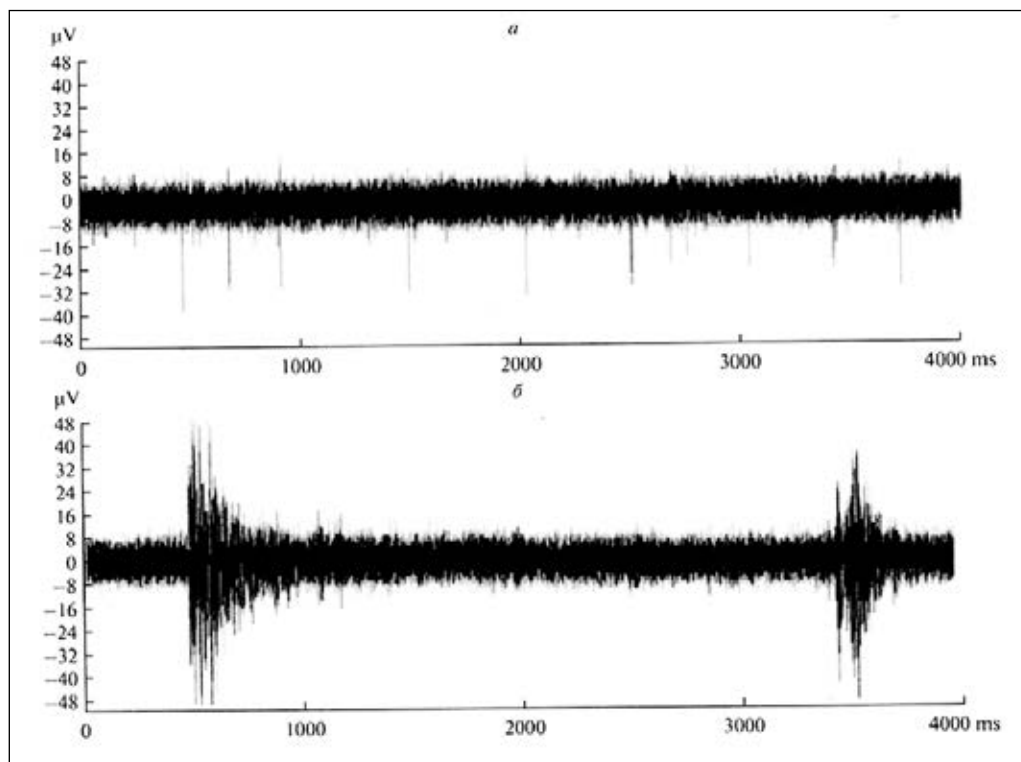


Рисунок 3. Спонтанная биоэлектрическая активность нейронов, дифференцированных из ИПСК и культивируемых на мультиэлектродной матрице.

А – 5 дней *in vitro*, одиночные спайки; Б – 10 дней *in vitro*, пачечная активность.

из ИПСК от больных с PARK8-формой аутосомно-доминантной БП, подтверждено наличие исходной мутации в гене *LRRK2* (G2019S).

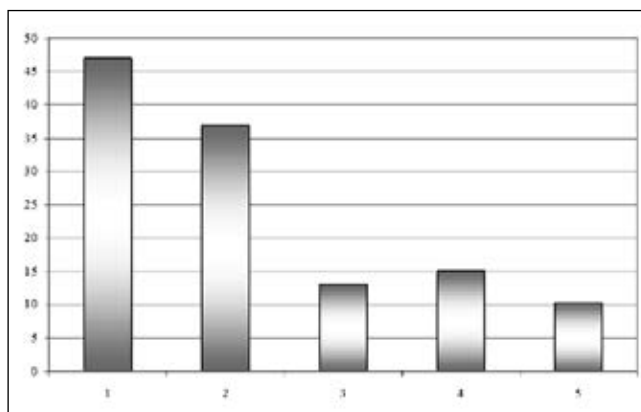
После прикрепления нейросфер, высаженных на мультиэлектродную матрицу, к опорному субстрату, на 2–3-й день *in vitro* из них начиналась миграция клеток, а к 7-му дню клетки формировали монослой, располагавшийся на микроэлектродах. Формирование отростками клеток связи между нейросферами было хорошо заметным (рис. 2).

С 3–5-го дня *in vitro* в культурах регистрировалась сетевая спонтанная биоэлектрическая активность в виде одиночных спайков, а с 8–10-го дня – более сложная и упорядоченная пачечная спайковая активность (рис. 3). Такая динамика свидетельствует о поэтапном развитии сложной нейронной сети и формировании новых межнейронных связей. Различий в характере сетевой активности между дифференцированными ИПСК, полученными от здоровых доноров и от пациентов с генетическими формами БП, не наблюдалось.

### 3. Эффект трансплантации ИПСК, дифференцированных в дофаминергические нейроны, в мозг крыс с экспериментальным паркинсонизмом.

У крыс с моделью паркинсонизма на протяжении 4 недель после введения 6-ОНДА происходило нарастание характерных двигательных симптомов (дискинезии, ригидности и птоза, рис. 4). К концу 4-й недели двигательная активность животных в «открытом поле» резко снижалась. Эти признаки свидетельствовали о развитии у крыс типичных признаков паркинсонического синдрома. После трансплантации ДЭН еженедельно проводилось тестирование поведения животных в «открытом поле». Через неделю после нейротрансплантации у всех крыс-реципиентов было отмечено заметное повышение двигательной активности в «открытом поле» (см. таблицу) и уменьшение ригидности и птоза. В течение следующих недель (вплоть до 6 недель наблюдения) двигательная активность, при определенной вариабельности, по-прежнему оставалась в целом статистически значимо более высокой по сравнению с активностью, зафиксированной до нейротрансплантации (таблица, рис. 5). Также к концу 6-й недели у оперированных животных полностью регрессировали мышечная ригидность, нарушения позы и птоза, отсутствовали проявления дискинезии.

Для оценки и верификации клеточного «субстрата» положительных клинических эффектов, получаемых после нейротрансплантации, у экспериментальных животных было проведено иммуноцитохимическое исследование вещества головного мозга. Как видно на рисунке 6 (см. цв. вкладку), после процедуры трансплантации в



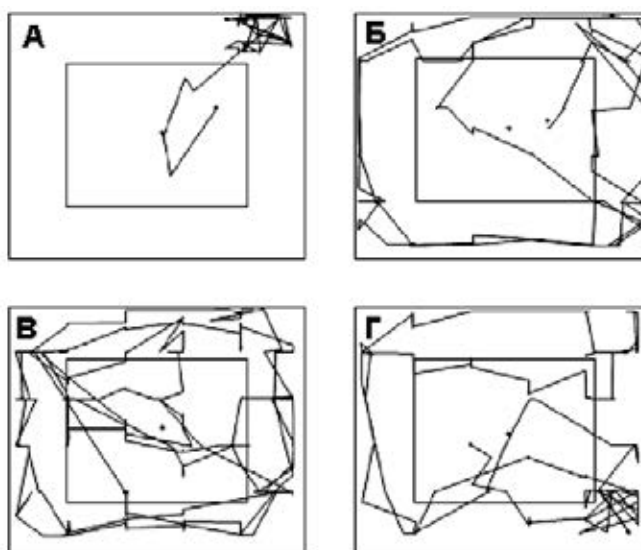
**Рисунок 4.** Горизонтальная двигательная активность животных в «открытом поле» после введения 6-ОНДА в черную субстанцию (средние значения).

По оси ординат – число пересеченных квадратов; 1 – до нейротоксического повреждения, 2, 3, 4, 5 – спустя 1, 2, 3 и 4 недели после повреждения, соответственно.

**Таблица.** Двигательная активность крыс в «открытом поле» после трансплантации дофаминергических нейронов.

№	До операции		Срок после операции нейротрансплантации											
			1 нед.		2 нед.		3 нед.		4 нед.		5 нед.		6 нед.	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
1	3,3	9	10,8	32	1,6	2	7,8	24	13,0	34	6,3	26	8,3	21
2	5,8	26	23,1	98	11,8	26	12,1	23	13,9	31	13,0	56	11,5	34
3	4,0	3	12,1	46	15,6	64	10,0	35	9,3	60	7,1	29	9,3	34
4	4,3	18	4,7	15	3,8	9	6,0	16	8,9	19	4,3	6	5,6	12
Среднее значение по группе	4,4	-	12,7*	-	8,2*	-	9,0*	-	11,3*	-	7,7*	-	8,7*	-

Примечание: I – расстояние, проходимое в «открытом поле» в течение 3 мин регистрации (м); II – число пересечений квадратов в «открытом поле» в течение 3 мин регистрации; \* –  $p < 0,05$  при сравнении с исходным значением.



**Рисунок 5.** Пример треков передвижения одной из крыс-реципиентов с 6-ОНДА-индуцированным паркинсонизмом по «открытому полю» (до и после трансплантации дофаминергических нейронов).

A – до трансплантации, B, В и Г – через 1, 2 и 6 недель после трансплантации, соответственно.

стриатуме крыс в области введения обнаруживаются ДЭН, идентифицируемые иммуноцитохимически по тирозингидроксилазе и ядерному белку человека.

### Обсуждение

Получение ИПСК и разработка технологий манипулирования с ними ознаменовали собой настоящий «прорыв» в клеточной биологии, предоставляющий уникальные возможности для создания адекватных клеточных моделей различных заболеваний и развития репаративной медицины, в том числе нейротрансплантации [2]. ИПСК имеют практически одинаковый с ЭСК потенциал дифференцировки, при этом для обоих указанных типов плюрипотентных клеток применяют сходные методики направленной индукции по определенному пути клеточной специализации, с получением производных всех трех зародышевых листков [1, 5, 13]. В неврологии особый интерес данный подход представляет применительно к нейродегенеративным заболеваниям (болезни Паркинсона, Альцгеймера, Гентингтона и др.), поскольку для данных форм патологии характерно сравнительно избирательное поражение определенных популяций нейронов, которые могут быть «воссозданы» из ИПСК.

В настоящей работе нами была поставлена задача получения культур нигральных дофаминергических нейронов от здоровых добровольцев и пациентов, страдающих БП. В основе данного заболевания лежит гибель именно указанного типа клеток в стволе головного мозга. Для включения в исследование были отобраны пациенты с наследственными формами БП (мутации генов *LRRK2* и *PARK2*), поскольку экспрессия патогенетически значимых мутаций в культивируемых нейронах может позволить оценить сложный молекулярный каскад событий, способствующих развитию нейродегенеративного процесса.

Из фибробластов пациентов с *PARK2* и *PARK8* формами БП нами были получены ИПСК, демонстрирующие важнейшие признаки плюрипотентности, такие как экспрессия *OCT4*, *SOX2* и других эмбриональных транскрипционных факторов, а также способность дифференцироваться в производные экто- мезо- и энтодермы. В дальнейших экспериментах из ИПСК пациентов с первичным паркинсонизмом были получены специализированные клетки – дофаминергические нейроны. Наличие характерных свойств (экспрессия специфических нейронных антигенов, в частности,  $\beta$ -3-тубулина) и специализированный характер полученных нейронов (экспрессия репрессора синтеза дофамина – тирозингидроксилазы) было подтверждено нами с помощью общепринятых молекулярных и иммуноморфологических клеточных маркеров. Прямым доказательством дифференцировки ИПСК в нейроны явилась способность изучаемых клеток к воспроизведению спонтанной сетевой биоэлектрической активности в процессе ее непрерывной неинвазивной регистрации, что было продемонстрировано с использованием одного из наиболее современных подходов к исследованию функциональных свойств нейронов *in vitro* – культивирования на мультиэлектродной матрице. Данная технология направлена на длительную неинвазивную регистрацию сигналов и стимуляцию культивируемых клеток мозга в сочетании с прижизненной структурно-функциональной визуализацией ионных токов в нейронах и глиальных клетках *in vitro* с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии [9, 15, 19]. Большой объем и хорошая воспроизводимость получаемых результатов, а также возможность их количественной оценки в условиях хронического многомесячного эксперимента позволяют отнести нейронные сети на мультиэлектродных матрицах к биосенсорам нового поколения, с помощью которых можно проводить эффективный фармакологический скрининг при моделировании различных форм неврологической патологии [9].

Принципиальная возможность применения дофаминергических нейронов, получаемых из репрограммированных фибробластов, в лечении БП показана нами в экспериментах с крысами: у животных с токсической 6-ОНДА-моделью паркинсонизма трансплантация таких клеток в полосатое тело приводила к отчетливому улучшению двигательных функций. Аналогичные результаты, свидетельствующие о положительном клиническом эффекте нейротрансплантации при экспериментальном паркинсонизме, были получены ранее другими авторами [20]. Трансплантация животным дофаминергических нейронов, получаемых из ИПСК, как показывают работы зарубежных исследователей и наш опыт, сопровождается хорошей выживаемостью вводимых в мозг реципиента клеток, формированием новых устойчивых межнейронных связей и повышением уровня дофамина в нигростриатной системе [7, 22]. По общему мнению, работы в данной области знаменуют собой качественно новый этап в становлении клеточной медицины.

Для практического внедрения ИПСК-ассоциированных технологий в клиническую практику требуется решить ряд сохраняющихся сложных проблем, связанных с риском онкотрансформации трансплантата, адресной доставкой трансплантируемых нейронов, стандартизацией протоколов направленной нейрональной дифференцировки и т.д. Для решения этих вопросов предлагаются различные подходы. Так, риск злокачественной трансформации клеток в процессе манипуляций с ними существенно снижается при использовании безвирусных методов индукции плюрипотентности (с помощью плазмид, мРНК, рекомбинантных транскрипционных факторов и т.д.) [2, 21, 23], а эффективность процесса репрограммирования может быть существенно повышена путем применения ингибиторов ДНК-метилтрансферазы, деацетилазы гистонов и других малых молекул [8, 16]. Очевидно,



что в ближайшие годы этим аспектам исследований будет уделено первоочередное внимание в ведущих лабораториях мира.

**Благодарность.** Работа поддержана грантом РФФИ № 13-04-01730.

#### Литература

1. Бочарова Л.С. Дифференцировка клеток обратима: соматические научились превращать в плюрипотентные стволовые. Биомед. журн. 2008; 9: 197-239.
2. Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Иллариошкин С.Н. и др. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: новые возможности в нейробиологии и нейротрансплантологии. Анн. клин. эксперимент. неврол. 2011; 4: 37-45.
3. Мухина И.В., Хаспекоев Л.Г. Мультиэлектродные матрицы – новые возможности в исследовании пластичности нейрональной сети. Анн. клин. эксперимент. неврол. 2010; 2: 44-51.
4. Некрасов Е.Д., Лебедева О.С., Честков И.В. и др. Получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2011; 4: 82-88.
5. Brambrink T., Foreman R., Welstead G.G. et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. Cell Stem Cell 2008; 2: 151-159.
6. Cooper O., Hallett P., Isacson O. Using stem cells and iPS cells to discover new treatments for Parkinson's disease. Parkinsonism Relat. Disord. 2012; 18 (Suppl. 1): S14-S16.
7. Hargus G., Cooper O., Deleidi M. et al. Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010; 107: 15921-15926.
8. Huangfu D., Maehr R., Guo W. et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. Nat. Biotechnol. 2008; 26: 795-797.
9. Kang G., Lee J.-H., Leeb C.-S., Nam Y. Agarose microwell based neuronal micro-circuit arrays on microelectrode arrays for high throughput drug testing. Lab. Chip. 2009; 9: 3236-3242.
10. Langston J.W. The promise of stem cells in Parkinson disease. J. Clin. Invest. 2005; 115: 23-25.
11. Meredith G.E., Sonsalla P., Chesselet M.P. Animal models of Parkinson's disease progression. Acta Neuropathol. 2008; 115: 385-398.
12. Mizuno Y., Hattori N., Kubo S. et al. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. Phil. Trans. R. Soc. B. 2008; 63: 2215-2227.
13. Park I.-H., Arora N., Huo H. et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. Cell 2008; 134: 877-886.
14. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain. Academic Press, 1997.
15. Pizzi R.M.R., Cino G., Gelain F. et al. Learning in human neural networks on microelectrode arrays. Biosystems 2007; 88: 1-15.
16. Shi Y., Desponts C., Do J.T. et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. Cell Stem Cell 2008; 3: 568-574.
17. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007; 131: 861-872.
18. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126: 663-676.
19. Takayama Y., Moriguchi H., Kotani K., Jimbo Y. Spontaneous calcium transients in cultured cortical networks during development. IEEE Trans. Biomed. Engin. 2009; 56: 2949-2956.
20. Xu L., Tan Y.Y., Ding J.Q., Chen S.D. The iPS technique provides hope for Parkinson's disease treatment. Stem Cell Rev 2010; 6: 398-404.
21. Warren L., Manos P. D., Ahfeldt T. et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. Cell Stem Cell 2010; 7: 618-630.
22. Wernig M., Zhao J.P., Pruszak J. et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008; 105: 5856-5861.
23. Yu J., Hu K., Smyga-Otto K. et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science; 2009; 324: 797-801.