

ИССЛЕДОВАНИЯ И КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.858-07:577.21.08

Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Степанова М.С., Тимербаева С.Л., Иллариошкин С.Н.

НОВЫЙ ПОДХОД К МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОМУ СКРИНИНГУ У ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва

Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой генетически гетерогенное заболевание, связанное с мутациями 20 различных хромосомных локусов. Поэтому традиционный мутационный скрининг известных генов данного заболевания путем прямого секвенирования весьма сложен, дорог и малоприменим на практике. Альтернативой является применение новых избирательных методов высокопроизводительного молекулярного анализа, интенсивно разрабатываемых в последние годы. Мы представляем результаты применения в большой группе пациентов с ранними и семейными случаями БП (153 больных) новой технологии мультиплексной пробозависимой лигазной реакции с амплификацией (MLPA), которая позволяет быстро осуществлять предварительный поиск большого числа мутаций в 6 основных генах паркинсонизма. С помощью MLPA нами в 6,5% обследованных случаев БП было выявлено носительство тех или иных мутаций в трех генах паркинсонизма: у 5 пациентов – в гене *PARK2*, у 4 – в гене *LRRK2* и у одного – в гене *PINK1* (это первое наблюдение *PINK1*-ассоциированной формы БП в нашей стране). Представлен анализ клинико-генетических корреляций, обсуждены перспективы использования MLPA-технологии в неврологической клинике.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; мутационный скрининг; *PARK2*; *LRRK2*; *PINK1*; MLPA.

Для цитирования: Абрамычева Н.Ю., Федотова Е.Ю., Степанова М.С., Тимербаева С.Л., Иллариошкин С.Н. Новый подход к молекулярно-генетическому скринингу у пациентов с болезнью Паркинсона. *Неврологический журнал* 2016; 21(1): 13–16. DOI 10.18821/1560-9545-2016-21-1-13-16.

Для корреспонденции: Иллариошкин Сергей Николаевич – д-р мед.наук, проф., зам. директора по научной работе, рук. отдела исследований мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии» Москва 125367, Волоколамское шоссе, д. 80, e-mail: snillario@gmail.com

Abramycheva N.Yu., Fedotova E.Yu., Stepanova M.S., Timerbaeva S.L., Illarioshkin S.N.

NEW APPROACH TO MOLECULAR AND GENETIC SCREENING OF PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE

FSBI «Research Center of Neurology» of Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russian Federation

Parkinson's disease is genetically heterogenous disease, associated with mutation of 20 different chromosome loci. That's why traditional mutation screening of famous genes by direct sequence analysis is too difficult, expensive and hardly suitable for use. Alternative method is the use of new selective method of highly efficient molecular analysis that has been intensively elaborated for recent years. We present the results of new technology appliance of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in the large group of patients with early debut and familial cases of Parkinson's disease (PD) (153 patients). The method allows fast search of mutations in 6 main genes of Parkinson's disease. Using this method in 6,5% of PD cases we revealed carriage of mutations in three parkinsonian genes: in *PARK2* gene – 5 cases, in *LRRK2* gene – 4 cases and in *PINK1* gene – one case (it's the first case of *PINK1*-associated PD in our country). The article presents clinical and genetic correlative analysis and perspectives of usage of MLPA – technology in neurological clinic.

Key words: Parkinson's disease, mutation screening, *PARK2*, *LRRK2*, *PINK1*, MLPA

For citation: Abramycheva N.Yu., Fedotova E.Yu., Stepanova M.S., Timerbaeva S.L., Illarioshkin S.N. New Approach to the Molecular and Genetic Screening in Patients with Parkinson's Disease. *Neurologicheskii Zhurnal (Neurological Journal)* 2016; 21 (1): 13–16 (Russian). DOI 10.18821/1560-9545-2016-21-1-13-16.

For correspondence: Sergey N. Illarioshkin – MD, PhD, DSc, professor of FSBI “Research Center of Neurology” of Russian Academy of Medical Sciences, 125367, Moscow, Russian Federation. e-mail: snillario@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The research is completed as a part of Federal dedicated program “Researches and elaborations in priority areas of science and technology sector of Russia for 2014-2020” (Protocol № 14.607.21.0094 d.d. 27.11.2014).

Received 18.10.15
Accepted 16.11.15

Болезнь Паркинсона (БП) является чрезвычайно гетерогенной: на сегодняшний день известно около двух десятков различных генов, которые могут приводить к ее развитию, и эти наследуемые формы могут, по некоторым оценкам, составлять до 20% всех случаев БП [1, 2]. Мутации в тех или иных генах чаще обнаруживаются при раннем развитии заболевания [3].

Изучение генетики БП позволило выделить определенные клинические особенности носительства

тех или иных мутаций. Однако только по клинической картине практически невозможно предположить конкретную молекулярно-генетическую форму заболевания. В связи с этим при медико-генетическом консультировании рекомендуется исследовать сразу несколько кандидатных генов, иногда суживая их спектр в зависимости от клинической картины и частоты встречаемости определенных мутаций в изучаемой популяции. Информация о выявленной ге-

нетической причине БП дает возможность говорить о прогностических аспектах самого заболевания у конкретного пациента, например о вероятности развития когнитивных и психотических нарушений, риске осложнений леводопа-терапии, скорости прогрессирования заболевания. Кроме этого, такая информация важна для медико-генетического консультирования в семьях пациентов с целью вторичного выявления лиц, предрасположенных к развитию БП.

Считается, что рутинное определение молекулярно-генетической формы БП трудозатратно в связи с разнообразием ассоциированных генов и мутаций: для каждого гена/мутации необходимо проведение отдельного анализа со своим лабораторно-техническим протоколом. Подобные сложности значительно ограничивают применение ДНК-диагностики в клинической практике при БП.

Благодаря появлению в последнее время нового метода – мультиплексной пробозависимой лигазной реакции с амплификацией (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification – MLPA) – стало возможным одномоментное исследование широкого спектра мутаций, в том числе ассоциированных с БП. Метод MLPA основан на использовании термостабильной лигазы для лигирования только полностью комплементарных последовательностей геномной ДНК олигонуклеотидных зондов. После лигирования продукты реакции амплифицируются с помощью праймеров, комплементарных зондам, и полученные продукты амплификации анализируются с использованием капиллярного гель-электрофореза. Данная методика является сравнительной, т.е. пики от исследуемых образцов ДНК сравниваются с пиками от референсных зондов и с пиками от референсной ДНК [4, 5]. В одном таком исследовании возможно провести скрининг мутаций в нескольких основных «паркинсонических» генах – таких, например, как гены *SNCA*, *PARK2*, *PINK1*, *PARK7*, *LRRK2* и *ATP13A2*, исследованные в настоящей работе [6]. Выбор их обоснован наибольшей частотой встречаемости и значимостью в структуре БП. Достоинством этого метода является возможность регистрировать изменения копийности экзонов генов: такие мутации, иногда захватывающие протяженные мультиэкзонные области, трудно диагностируются обычными методами.

Материалы и методы

Обследованы 153 больных БП (86 женщин, 67 мужчин), наблюдавшихся в Научном центре неврологии. Средний возраст пациентов составил $58,3 \pm 10,9$ года, возраст начала заболевания – $50,7 \pm 12,1$ года. В группу вошло 49 пациентов с ранним началом БП (дебют симптомов до 45 лет) и 55 пациентов с отягощенным семейным анамнезом. Именно у этих категорий больных вероятность выявления мутаций максимальна. Все образцы крови были взяты с информированного согласия исследуемых лиц.

Образцы геномной ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови с помощью набора для выделения Wizard Genomic DNA Purification Kit («Promega», США). В работе использовался набор SALSA MLPA P051-C2 («MRC-Holland», Нидерланды), в ко-

торый входят реактивы для выявления следующих мутаций в генах:

- ген *SNCA*: мутация A30P, делеции/дупликации экзонов 2–7;
- ген *PARK2*: делеции/дупликации экзонов 1–12;
- ген *PINK1*: делеции/дупликации экзонов 1–8;
- ген *PARK7*: делеции/дупликации экзонов 1, 3, 5, 7;
- ген *LRRK2*: мутация G2019S;
- ген *ATP13A2*: делеции/дупликации экзонов 2 и 9.

Молекулярно-генетический протокол MLPA состоял из следующих шагов: ДНК-денатурация, гибридизация зондов с образцами ДНК, сшивание гибридизированных проб, ПЦР-амплификация лигазных проб, капиллярный электрофорез, анализ результатов. Анализ нуклеотидных последовательностей проводили на капиллярном генетическом анализаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems») с помощью программного обеспечения Data Collection Software v.3.0, Sequencing Analysis Software v.5.2 и SeqScape Software v.2.5.

В каждом случае оценка числа копий продуктов реакции проводилась по стандартным коэффициентам нормализации: 1) норма – 0,85–1,15; 2) гетерозиготная дупликация – 1,35–1,55; 3) гомозиготная дупликация – 1,70–2,20; 4) гетерозиготная делеция – 0,35–0,65; 5) гомозиготная делеция – 0. Пример результатов MLPA-анализа при гетерозиготной делеции 3-го экзона в гене *PARK2* представлен на рисунке (см. цв.вклейку).

Результаты

По результатам проведенного исследования из 153 пациентов у 10 (6,5%) было выявлено носительство мутаций в генах *PARK2*, *PINK1* и *LRRK2*. Мутации в гене *PARK2* были выявлены у 5 пациентов: по одному случаю гетерозиготной делеции экзонов 2, 3, 3–4, 3–5 и 8. Мутация в гене *PINK1* выявлена у одного пациента (гетерозиготная делеция экзона 3), мажорная мутация G2019S в гене *LRRK2* – у 4 пациентов. Встречаемость носительства мутаций в группах с ранним/поздним началом заболевания, а также среди семейных/спорадических случаев представлена в таблице. В генах *SNCA*, *PARK7*, *ATP13A2* мутаций обнаружено не было.

Клинически группа пациентов с мутациями в гене

Таблица

Распределение носительства мутаций в исследованных генах в зависимости от возраста начала заболевания и отягощенности по семейному анамнезу

Встречаемость	Носители мутаций в гене <i>PARK2</i> , абс. (%)	Носители мутаций в гене <i>PINK1</i> , абс. (%)	Носители мутаций в гене <i>LRRK2</i> , абс. (%)
В общей выборке ($n = 153$):	5 (3,3)	1 (0,6)	4 (2,6)
с ранним началом ($n = 49$)	3 (6,1)	0	1 (2,0)
с поздним началом ($n = 104$)	2 (1,9)	1 (0,9)	3 (2,9)
семейные случаи ($n = 55$)	1 (1,8)	1 (1,8)	2 (3,6)
спорадические случаи ($n = 98$)	4 (4,1)	0	2 (2,0)

PARK2 отличалась более молодым возрастом начала симптоматики, в том числе у двоих – раннее начало (в 30 и 35 лет) и у одного – ювенильный возраст начала (в 10 лет). Из 5 носителей только у одного отмечался отягощенный семейный анамнез по БП. В клинической картине у 4 больных на фоне леводопа-терапии наблюдались выраженные, инвалидизирующие лекарственные дискинезии (в том числе в одном случае с поздним началом болезни).

Отдельного внимания и описания заслуживает редкий случай носительства мутации в гене *PINK1*. Это первое наблюдение данной формы паркинсонизма в России. У пациента в возрасте 62 лет основные жалобы были представлены дрожанием рук (больше правой), общей замедленностью, нечеткостью речи, повышенным слюноотделением, снижением памяти, частыми эпизодами тревоги и депрессии, нарушением сна. Длительность заболевания до поступления на стационарное лечение в Научный центр неврологии составила около двух лет, первыми признаками БП явились эпизоды легкого дрожания в правой руке и общая замедленность. Спустя несколько месяцев от начала заболевания в связи с паническими атаками и депрессией, возникшими на фоне стресса, проходил курс стационарного лечения в психиатрической клинике, после которого отметил существенное усиление тремора, появление слюнотечения, изменения походки, дикции. Семейный анамнез по БП отягощен: у матери с 60 лет отмечались тремор рук и нарастающая общая скованность, у бабушки по материнской линии также был тремор рук. Из сопутствующей патологии: длительная артериальная гипертензия и сахарный диабет 2-го типа. При осмотре в неврологическом статусе: тревожно-депрессивный синдром, легкая девиация языка вправо, выраженная гипомимия, гиперсаливация, гипокинезия с акцентом слева при отсутствии ригидности, высокоамплитудный тремор покоя в правой руке, в меньшей степени в правой ноге, сутулость. Постуральной неустойчивости нет, легкая микробазия. При МРТ-исследовании головного мозга выявлены неспецифические изменения сосудистого генеза. При проведении транскраниальной сонографии – небольшое двустороннее повышение площади гиперэхогенного сигнала от области черной субстанции (21 мм² с двух сторон). При назначении противопаркинсонической терапии, в том числе леводопа-содержащих препаратов, отмечалась существенная положительная динамика в виде уменьшения тремора и гипокинезии.

В группе носителей мутации G2019S в гене *LRKK2* преобладал фенотип с поздним началом, в половине случаев отмечался отягощенный семейный анамнез. В двух случаях к двигательным проявлениям БП присоединились тяжелые психотические нарушения с галлюцинозом и когнитивные нарушения. У одной пациентки с ранним началом симптоматики уже на начальных этапах лечения в клинической картине преобладали лекарственные дискинезии и моторные флюктуации.

Обсуждение

В настоящей работе была исследована достаточно большая выборка пациентов с БП с помощью нового скринингового метода, который, как ожидается, найдет достойное место в клинической практике. По ре-

зультатам исследования выявлены носители мутаций в ряде генов паркинсонизма и проведены клинико-генетические сопоставления.

Общая встречаемость носительства мутаций, выявленных с помощью MLPA, составила 6,5%. Это покрывает более четверти того, что можно выявить при тщательном и широком молекулярно-генетическом исследовании всех известных мутаций и генов, ассоциированных с БП. Следовательно, выявляя достаточно высокий процент молекулярных дефектов, MLPA может рассматриваться как эффективный скрининговый метод.

В настоящее время принято считать, что мутации в гене *PARK2* являются самой частой причиной развития БП. В нашей работе доля пациентов с делециями в гене *PARK2* составила 3,3%. Полученная частота носительства мутаций *PARK2* сопоставима с результатами многочисленных исследований, проведенных в США, – 3,5–3,6% [7, 8], Великобритании – 3,7% [9], Польше – 4,7% [10]. В наших предыдущих исследованиях с использованием традиционных методов ДНК-диагностики также были показаны сравнимые результаты – 5,8% [11] и 3,8% [12]. На сегодня считается доказанной патогенетическая значимость не только гомозиготных, но и гетерозиготных и мутаций *PARK2* [1, 13]. Отметим, что в нашей работе с помощью метода MLPA исследовался только один тип мутаций – экзонные перестройки, что составляет от 33 до 67% от всех мутаций *PARK2*; нами не исследовались миссенс-мутации в данном гене, которых описано свыше 120 [8], поэтому общий процент встречаемости паркинсопатий в целом может быть существенно больше.

Среди важных клинических особенностей паркинсопатий следует отметить раннее начало, сравнительно медленное прогрессирование, частое развитие пирамидного синдрома и статокINETического тремора рук, дневные флюктуации выраженности симптомов, высокую чувствительность к леводопе и быстрое появление дискинезий даже на фоне приема небольших доз препарата, редкое развитие вегетативных и когнитивных нарушений [14]. Большинство из характерных клинических признаков были отмечены и в нашей группе носителей мутаций *PARK2*.

Сходной по клинической картине является генетическая форма, обусловленная гомозиготными мутациями в гене *PINK1*. Благодаря методу MLPA нам удалось выявить случай гетерозиготного носительства в этом гене; таким образом, встречаемость экзонных перестроек в *PINK1* составила в нашей группе 0,6%. Для сравнения: частота мутаций *PINK1* в исследовании, проведенном в Великобритании, составила 0,7% [9], в Польше – 2,7% [10], в Иране – до 11% [15]. В нашей стране этот случай является первым клиническим описанием доказанного носительства мутации в гене *PINK1*. В отличие от гомозиготного носительства с ранним началом заболевания, для гетерозиготного носительства характерен классический идиопатический фенотип позднего паркинсонизма, что и наблюдалось у выявленного нами пациента. Рядом исследователей показано, что для *PINK1*-формы БП достаточно характерна тревожная и депрессивная симптоматика, встречающаяся в трети случаев и

часто предшествующая двигательным нарушениям. В описанном нами случае также, помимо двигательных симптомов, присутствовали клинически значимые тревога и депрессия, которые на определенном этапе потребовали обращения к психиатру.

Одной из наиболее распространенных генетических форм БП является *LRRK2*-ассоциированный паркинсонизм. В гене *LRRK2* выявлено более 50 мутаций, наиболее частая из них – миссенс-мутация G2019S, встречающаяся в европейской популяции с частотой 0,4–10% в зависимости от наличия или отсутствия семейного анамнеза. В данной работе частота встречаемости оказалась равной 2,6%. По результатам предыдущих наших исследований с использованием других молекулярно-генетических методов, доля носителей G2019S составила 1,1% [11], среди спорадических – 0,7%, среди семейных – 7,7% [14, 16]. По клиническим характеристикам в большинстве случаев *LRRK2*-паркинсонизм близок к обычной клинической картине БП с поздним началом заболевания, реже он может быть представлен фенотипом деменции с тельцами Леви. У выявленных нами носителей также преобладал классический фенотип БП, при этом в половине случаев отмечено развитие деменции.

В настоящей работе не было выявлено носительство мутаций в генах *SNCA*, *PARK7* и *ATP13A2*, которые, согласно многим исследованиям, также редки в других популяциях. Несмотря на то что исторически ген *SNCA* был при БП открыт первым, мутации в нем описаны лишь в единичных семьях. Фенотип зависит от дозы гена и варьирует от идиопатической БП при дупликацией гена *SNCA* до деменции с тельцами Леви при его трипликации. Мутации в гене *DJ-1* встречаются достаточно редко (1%) и клинически проявляются ранним паркинсонизмом, сходным с *PRKN*-ассоциированным фенотипом. В отличие от всех предыдущих форм заболевания редкая *ATP13A2*-ассоциированная форма паркинсонизма фенотипически проявляется ранним атипичным паркинсонизмом с быстрым прогрессированием, транзиторным ответом на леводопа-терапию, дополнительными пирамидными знаками и выраженными когнитивными нарушениями [17].

Следует отметить определенные особенности исследованной выборки пациентов с БП, которые могут влиять на интерпретацию полученных результатов. В группе исследованных больных была несколько большая доля случаев с ранним началом и с отягощенным семейным анамнезом по БП, чем в других исследованиях. В связи с этим полученные значения встречаемости мутаций могут рассматриваться как ориентировочные, хотя в целом они сопоставимы с данными литературы. Следует добавить, что данный ДНК-анализ выявляет лишь определенные мутации, и реальный список генных повреждений, ассоциированных с БП, существенно шире. Несмотря на указанные ограничения, в работе показана достаточно высокая эффективность MLPA как скринингового метода для определения генетических форм БП.

Таким образом, учитывая возможность одномоментного исследования основных мутаций, ассоциированных с БП, относительно невысокую стоимость и быстроту получения результата, метод MLPA может

рекомендоваться для медико-генетического консультирования пациентов, страдающих БП, в качестве первоначального генетического скринингового тестирования.

Благодарность: работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Соглашение № 14.607.21.0094 от 27.11.2014).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Klein C., Lohmann-Hedrich K., Rogaeva E. et al. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 652–62.
2. Singleton A.B., Farrer M.J., Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov. Disord.* 2013; 28: 14–23.
3. Corti O., Lesage S., Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev.* 2011; 91: 1161–218.
4. Shen Y., Wu B.-L. Dedicating a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. *J. Genet. Genomics.* 2009; 36: 257–65.
5. Stuppia L., Antonucci I., Palka G., Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 3245–76.
6. Scarciolla O., Brancati F., Valente E.M. et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification assay for simultaneous detection of Parkinson's disease gene rearrangement. *Mov. Disord.* 2007; 22: 2274–78.
7. Alcalay R.N., Caccappolo E., Mejia-Santana H. et al. Frequency of known mutations in early onset PD: implication for genetic counseling: the CORE-PD study. *Arch. Neurol.* 2010; 67: 1116–22.
8. Marder K., Tang M.-X., Mejia-Santana H. et al. Predictors of Parkinson mutations in early onset Parkinson disease: the CORE-PD study. *Arch. Neurol.* 2010; 67: 731–8.
9. Kilariski L.L., Pearson J.P., Newsway V. et al. Systematic review and UK-based study of PARK2 (parkin), PINK2, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2012; 27: 1522–9.
10. Koziariwski D., Hoffman-Zacharska D., Stawek J. et al. Incidence of mutations in the PARK2, PINK1, PARK7 genes in Polish early-onset Parkinson disease patients. *Neurol. Neurochir. Pol.* 2013; 47: 319–24.
11. Багыева Г.Х. Клинико-генетический и биохимический анализ болезни Паркинсона: механизмы предрасположенности, экспериментальные модели, подходы к терапии: Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2009.
Bagyeva G.Kh. *Kliniko-geneticheskiy i biokhimicheskiy analiz bolezni Parkinsona: mekhanizmy predraspolozhennosti, eksperimental'nye modeli, podkhody k terapii*: Dis. Moscow; 2009. (in Russian)
12. 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: 139–42.
13. Kay D.M., Stevens C.F., Hamza C.F. et al. A comprehensive analysis of deletions, multiplications, and copy number variations in PARK2. *Neurology.* 2010; 75: 1189–94.
14. Иллариошкин С.Н., Сломинский П.А., Шадрина М.И. и др. Гетерогенность спорадической болезни Паркинсона: молекулярный подход к решению проблемы. *Анналы клинической экспериментальной неврологии.* 2007; 1(1): 23–31.
Illarioshkin S.N., Slominsky P.A., Shadrina M.I. et al. Heterogeneity of sporadic Parkinson's disease: molecular approach to the solving of the problem. *Annaly klinicheskoy i eksperimental'noy nevrologii.* 2007; 1(1): 23–31. (in Russian)
15. Darvish H., Movafagh A., Omrani M.D. et al. Detection of copy number changes in genes associated with Parkinson's disease in Iranian patients. *Neurosci. Lett.* 2013; 551: 75–8.
16. Illarioshkin S.N., Shadrina M.I., Slominsky P.A. et al. A common leucine-rich repeat kinase 2 gene mutation in familial and sporadic Parkinson's disease in Russia. *Eur. J. Neurol.* 2007; 14: 413–7.
17. Klein C., Westenberger A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2. doi: 10.1101/cshperspect.a008888.