

ВКЛАД ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНА LRRK2 В РАЗВИТИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

Алексей Алексеевич Татпахов, Татьяна Егоровна Попова,
Полина Иннокентьевна Голикова, Татьяна Гаврильевна Говорова

Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Медицинский институт,
677000, г. Якутск, ул. Белинского, д. 58, e-mail: dralex89@mail.ru

Реферат. Мутации в гене LRRK2 встречаются у 1–5% пациентов со спорадической и у 5–20% пациентов с семейной формой болезни Паркинсона, а также у 1,8% здоровых лиц. Целью исследования явилось изучение вклада полиморфизмов *rs7966550*, *rs1427263* и *rs11176013* гена *LRRK2* в развитии болезни Паркинсона. Исследованием были охвачены 49 пациентов с болезнью Паркинсона, а также 46 контрольных лиц. В результате выявлено, что носительство мутантного генотипа *CC* полиморфизма *rs7966550* повышает шанс заболевания в 37,9 раз. По другим полиморфизмам значимые различия не обнаружены. Не выявлено взаимосвязи между генотипами изученных полиморфизмов и клинической картиной заболевания. По частоте различных генотипов трех изученных полиморфизмов гена LRRK2 статистически значимые различия по этнической принадлежности не выявлены.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, наследственность, полиморфизм, генетический анализ.

ASSOCIATION OF LRRK2 GENE POLYMORPHISMS
WITH THE DEVELOPMENT OF PARKINSON'S DISEASE

Alexey A. Tappakhov, Tatiana E. Popova,
Polina I. Golikova, Tatiana G. Govorova

M.K. Ammosov North-Eastern Federal University,
Medical Institute, 58, Belinsky st., Yakutsk, 677000,
e-mail: dralex89@mail.ru

Mutations in the LRRK2 gene occur in 1–5% of patients with sporadic form and in 5–20% of patients with the family form of Parkinson's disease, as well as in 1.8% of healthy individuals. The aim of the research was to study the association of polymorphisms *rs7966550*, *rs1427263* and *rs11176013* in the *LRRK2* gene with the development of Parkinson's disease. The research covered 49 patients with Parkinson's disease, as well as 46 control persons. As a result, it was revealed that the carriage of the mutant *CC* genotype of polymorphism *rs7966550* increases the odds ratio by 37.9 times. There were no significant differences in other polymorphisms. There was no correlation between the genotypes of the studied polymorphisms and the clinical picture of the disease. Statistically significant differences in ethnicity and frequency of different genotypes in polymorphisms have not been identified.

Key words: Parkinson's disease, heredity, polymorphism, genetic analysis.

Болезнь Паркинсона (БП) относится к мультифакторным заболеваниям, при которых в реализации генетических механизмов развития патологического процесса большую роль играют экзогенные воздействия [2]. Отягощенный семейный анамнез выявляется у 10–15% пациентов, причем наличие БП у близких родственников может увеличить риск заболевания в 2–10 раз в зависимости от степени родства [3, 19]. В настоящее время известны около 20 наследственных форм БП, которые могут различаться по клинической картине, возрасту дебюта и скорости прогрессирования нейродегенеративного процесса [2, 10, 19]. Хотя в подавляющем большинстве случаев БП носит спорадический характер, определенная генетическая предрасположенность может проследиваться в 27–40% всех случаев заболевания [16].

Особый интерес для изучения представляет ген *LRRK2* (*leucine-rich repeat kinase*), поскольку мутации в данном гене встречаются у 1–5% пациентов со спорадической и у 5–20% пациентов с семейной формой БП, а также у 1,8% здоровых лиц [9]. Ген *LRRK2* расположен на хромосоме 12p12, включает 51 экзон, кодирующий белок *дардарин* (*dardara* при переводе с баскского «тремор»), который состоит из 2527 аминокислот. Ген включает несколько доменов: *ARM* (Armadillo), *ANK* (ankyrin repeat), *LRR* (leucine-rich repeat), *Roc* (Ras of complex protein: GTPase), *COR* (COOH-terminal of Roc), домен тирозин-подобной киназы (*TKL*), *MAPKKK* (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) и *WD40* [10].

Целью исследования было изучение вклада полиморфизмов *rs7966550*, *rs1427263* и *rs11176013* гена *LRRK2* в развитии БП.

Материалы и методы исследования. В основную группу были включены 49 неродственных пациентов с верифицированным диагнозом БП согласно критериям Банка головного мозга общест-

ва БП Великобритании за исключением пункта о наличии одного или более родственника первой степени родства. Из них 22 (44,9%) мужчины и 27 (55,1%) женщин, медиана возраста составила 69,0 [64,0; 75,0] лет, медиана возраста дебюта заболевания – 63,0 [55,5; 68,5] года. Все пациенты имели 2–4 стадии болезни по шкале Хен-Яра. По клинической картине смешанная (акинетико-ригидно-дрожательная) форма выявлена у 35 (71,4%) пациентов, акинетико-ригидная – у 7 (14,3%), дрожательная – у 7 (14,3%). Наследственный анамнез был прослежен у 10 (20,4%) пациентов. По этнической принадлежности 30 (61,2%) пациентов относились к якутской этнической, остальные 19 (38,8%) – к русской этнической группам. Контрольная группа включала 46 лиц без БП и отягощенной наследственности, сопоставимых по половозрастному и этническому признакам с основной исследуемой группой. Медиана возраста составила 65,0 [62,0; 72,25] лет ($p = 0,06$). Из 46 человек мужчин было 21 (45,7%), женщин – 25 (54,3%) ($p = 0,94$). К якутской и русской этническим группам относились 21 (45,7%) и 25 (54,3%) человек соответственно ($p = 0,94$).

содержит: 1) 5 мкл смеси qPCRmax–HS SYBR; 2) 0,4 мкМ прямого праймера; 3) 0,4 мкМ обратного праймера; 4) 1 нг изучаемой ДНК; 5) 18,2 мкл стерильной воды. Контрольный образец, содержащий 1 нг стерильной воды вместо ДНК, включался в каждый анализ.

Программа амплификации включала предварительную денатурацию при 95°C в течение 5 минут, далее 40 циклов денатурации при 94°C в течение 30 с, отжига при 66,5°C в течение 30 с и элонгации при 72°C при 45 с. После завершения амплификации начинали процесс плавления при температуре от 70°C с шагом 0,5°C до 95°C с последующим анализом пиков температуры плавления.

Статистическая обработка результатов исследования производилась с использованием программы SPSS Statistics 22 (США, договор от 14.08.2014 г. № 2037–08/14). Поскольку количественные данные более чем в 50% не подчинялись закону нормального распределения, описательная статистика для них приведена в виде медианы и 25 и 75 квантилей (Me [Q25; Q75]). Анализ данных для двух независимых групп был проведен с использованием U-критерия Манна–Уитни. Соот-

Таблица 1

Нуклеотидная последовательность праймеров

Маркер	Нуклеотидная последовательность прямого и обратного праймеров
<i>rs7966550</i>	F: 5'–ACGTTGGATGCTTACTGAGTGAATCATCTG–3' R: 5'–ACGTTGGATGGGCCCATTTTGTATCATGAAG–3'
<i>rs1427263</i>	F: 5'–ACGTTGGATGTTTTCCACATCTCTACGCG–3' R: 5'–ACGTTGGATGGTGAAAGTGGAAGGTTGTCC–3'
<i>rs11176013</i>	F: 5'–ACGTTGGATGTATTCGCGTAGAGATGTGG–3' R: 5'–ACGTTGGATGCTATTGGCAAAGCAATCTGG–3'

Забор крови выполнялся из кубитальной вены в вакуумные пробирки Improvacuter с EDTA в объеме 10 мл. Экстракция ДНК проводилась с использованием комплекта реактивов «ДНК-сорб-В» (Медиген, Россия). Генотипирование ДНК проводилось на амплификаторе CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием реакционной смеси qPCRmax–HS SYBR и синтезированных праймеров (ЗАО «Евроген», Россия). Нуклеотидная последовательность прямого и обратного праймеров исследованных однонуклеотидных полиморфизмов представлена в табл. 1.

Для проведения ПЦР готовили реакционную смесь, которая при расчете на одну пробу

ношение частот генотипов и аллельных вариантов генов проверялось на соответствие закону Харди–Вайнберга. Частоты генотипов и аллелей каждого полиморфизма рассчитывались в % от общего их количества, принятого за 100%, с вычислением относительных шансов (ОШ) и 95% доверительного интервала (ДИ). Критический уровень статистической значимости для двух групп определен при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования. В результате исследования однонуклеотидного полиморфизма *rs7966550* выявлено, что носительство мутантного гомозиготного генотипа *CC* встречается исключительно среди группы пациентов с БП с увеличе-

Таблица 2

Связь полиморфизмов гена *LRRK2* с болезнью Паркинсона, абс. (%)

Генотип	Пациенты с БП, n = 49	Контроль, n = 46	χ^2	p	ОШ (95 % ДИ)
rs7966550 (T>C)					
TT	34 (69,4)	46 (100)	16,72	0,0002	0,02 (0 – 0,41)
TC	1 (2,0)	0			2,88 (0,1 – 72,4)
CC	14 (28,6)	0			37,9 (2,2 – 658,6)
rs1427263 (G>T)					
GG	25 (51,0)	32 (69,6)	2,08	0,15	0,46 (0 – 0,41)
GT	21 (42,9)	11 (23,9)			2,39 (0,1 – 72,4)
TT	3 (6,1)	3 (6,5)			0,93 (2,2 – 658,6)
rs11176013 (A>G)					
AA	11 (22,4)	33 (71,7)	23,7	< 0,0001	0,11 (0,05 – 0,29)
AG	36 (73,5)	13 (28,3)			7,03 (2,85 – 17,33)
GG	2 (4,1)	0			4,89 (0,23 – 104,7)

Таблица 3

Частота генотипов в изученных полиморфизмах гена *LRRK2* у пациентов с болезнью Паркинсона по этнической принадлежности, абс. (%)

Генотип	Якутская этническая группа, n = 30	Русская этническая группа, n = 19	χ^2	p	ОШ (95 % ДИ)
rs7966550 (T > C)					
TT	23 (76,7)	11 (57,9)	3,21	0,2	2,39 (0,69 – 8,28)
TC	1 (3,3)	0			1,98 (0,08 – 51,21)
CC	6 (20,0)	8 (42,1)			0,34 (0,1 – 1,23)
rs1427263 (G > T)					
GG	18 (60)	7 (36,8)	2,9	0,23	2,57 (0,79 – 8,4)
GT	10 (33,3)	11 (57,9)			0,36 (0,11 – 1,19)
TT	2 (6,7)	1 (5,3)			1,29 (0,11 – 15,2)
rs11176013 (A > G)					
AA	8 (26,7)	3 (15,8)	2,37	0,31	1,94 (0,44 – 8,48)
AG	20 (66,6)	16 (84,2)			0,38 (0,09 – 1,60)
GG	2 (6,7)	0			3,42 (0,16 – 75,23)

нием относительного шанса заболевания в 37,9 раз ($p=0,0002$). По частоте генотипов полиморфизма *rs1427263* статистически значимые различия не выявлены ($p=0,15$). Несколько противоречивые данные получены при изучении полиморфизма *rs11176013*. Так, носительство мутантного гомозиготного генотипа GG сопровождалось увеличением относительного шанса в 4,89 раза, в то же время носительство гетерозиготного генотипа AG – в 7,03 раза. В табл. 2 приведены сводные данные о взаимосвязи полиморфизмов гена *LRRK2* с развитием БП.

Мутантный генотип CC полиморфизма *rs7966550* гена *LRRK2* выявлялся у 78,6% паци-

ентов с акинетико-ригидно-дрожательной формой БП, однако статистически значимое различие не обнаружено ($p=0,15$). Медиана возраста дебюта болезни в зависимости от генотипа данного полиморфизма также статистически значимо не различалась. По другим изученным полиморфизмам – *rs1427263* и *rs11176013* – статистически значимые различия по форме БП и медиане возраста дебюта не обнаружены.

Было изучено влияние полиморфных вариантов гена *LRRK2* на развитие семейных форм БП. Так, из десяти случаев заболевания с отягощенным семейным анамнезом мутантный генотип CC полиморфизма *rs7966550* был выявлен у 5

(50,0%), мутантный генотип *TT* полиморфизма *rs1427263* – у 1 (10,0%), генотип *GT* полиморфизма *rs1427263* – у 5 (50,0%) пациентов. Генотип *AG* полиморфизма *rs11176013* встречался у 8 (80,0%) пациентов с БП с семейной отягощенностью.

Изучение частоты различных генотипов полиморфизмов *rs7966550*, *rs1427263* и *rs11176013* гена *LRRK2* у пациентов с БП двух этнических групп (якутской, русской) статистически значимого различия не выявило (табл. 3).

Обсуждение. В последние годы передовые возможности генетического обследования существенно ускоряют поиск новых мутаций [7]. В России проведены широкомасштабные исследования для определения роли мутаций в генах *PARK2*, *SNCA*, *LRRK2*, *GBA* в развитии БП [4, 5, 6]. В 2017 году опубликованы результаты крупного исследования ассоциации полиморфных вариантов генов дофаминергической системы с БП [1].

Впервые мутации в гене *LRRK2* описаны в 2002 году в японской семье, которая страдала аутосомно-доминантной формой БП с поздним началом и с хорошей леводопа-чувствительностью [13]. В 2004 году идентифицирован полиморфизм *rs34637584* гена *LRRK2*, который приводит к замене глицина на серин в позиции 2019 (мутация *G2019S*) [11]. Пенетрантность данной мутации вариабельна и увеличивается в зависимости от возраста пациента, составляя 28% в 59 лет, 51% – в 69 и 74% – в 79 [15]. В России мутация *G2019S* выявлена у 5,9% пациентов с аутосомно-доминантной БП [18].

В азиатской популяции идентифицированы два полиморфизма (*G2385R* и *R1628P*) в гене *LRRK2*, которые увеличивают риск БП. Так, в китайской популяции частота мутации *G2385R* (*rs34778348*) при БП составляет более 8% [8]. Гетерозиготный генотип *G2385R* также был выявлен у пациентов с БП Тайваня и Японии [12, 14]. В корейской популяции среди больных с БП мутация *G2385R* обнаруживалась в 8,9% случаев [17].

Представляется весьма интересным, что в нашей исследованной подборке гомозиготное носительство мутантного аллеля *C* полиморфизма *rs7966550* выявлено исключительно среди пациентов с БП и сопровождалось увеличением относительного шанса ее развития в 37,9 раза. Наши данные дополняют результаты исследования Н.А. Шнайдер и М.Р. Сапроновой [5], которые опреде-

лили, что полиморфизмы *rs1427263*, *rs11176013*, сцепленные с геном *LRRK2*, не ассоциируются с развитием БП, а частота встречаемости генетического маркера *rs7966550* по гомозиготному генотипу *CC* в группе пациентов с БП выше, чем в группе здоровых добровольцев (44,5 % против 16,5 %). Полученные данные, а именно проведение генетического анализа на наличие мутации по полиморфизму *rs7966550* гена *LRRK2*, могут быть использованы для оценки шансов развития болезни Паркинсона у лиц с отягощенным анамнезом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахмадеева Г.Н., Хидиятова И.М., Насибуллин Т.Р. и др. Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов дофаминергической системы (*DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4*, *TH*, *COMT* и *MAO-B*) с идиопатической болезнью Паркинсона // Якутский медицинский журнал. 2017. № 3 (59). С. 5–9.
2. Иллариошкин С.Н. Этиология болезни Паркинсона: новые представления и новые вызовы. В кн.: Болезнь Паркинсона и расстройства движений: руководство для врачей по материалам III Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с международным участием). М.: ЗАО «РКИ Соверо пресс», 2014. С. 5–13.
3. Левин О.С., Шиндряева Н.Н., Докадина Л.В. Клиническая эпидемиология болезни Паркинсона. В кн.: Экстрапирамидные расстройства: вчера, сегодня, завтра. Сборник статей. М., 2013. С. 41–52.
4. Пчелина С.Н., Емельянов А.К., Усенко Т.С. Молекулярные основы болезни Паркинсона, обусловленной мутациями в гене *LRRK2* // Молекулярная биология. 2014. Т. 48, № 1. С. 3.
5. Сапронова М.Р., Шнайдер Н.А. Эпидемиологическая и клиничко-генетическая характеристика болезни Паркинсона (на примере Железногорска) // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2014. №4. С. 59–64.
6. Шадрин М.И., Иллариошкин С.Н., Багыева Г.Х. и др. *PARK8*-форма болезни Паркинсона: мутационный анализ гена *LRRK2* в российской популяции // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2007. Т. 107, № 3. С. 46–50.
7. Шульская М.В., Зырин В.В., Федотова Е.Ю. и др. Полноэкзомное секвенирование в изучении генетических основ болезни Паркинсона. В кн.: Болезнь Паркинсона и расстройства движений: руководство для врачей по материалам IV Национального конгресса (с международным участием). М., 2017. С. 52–55.
8. Chan D., Ng P., Mok V. et al. *LRRK2* Gly2385Arg mutation and clinical features in a Chinese population with early-onset Parkinson's disease compared to late-onset patients // J. Neural. Transm. 2008. Vol. 115, №9. P. 1275–1277.
9. Correia Guedes L., Ferreira J., Rosa M. et al. Worldwide frequency of *G2019S* *LRRK2* mutation in Parkinson's disease: a systematic review // Parkinsonism Relat. Disord. 2010. Vol. 16, №4. P. 237–242.
10. Corti O., Lesage S., Brice A. What Genetics Tells us About the Causes and Mechanisms of Parkinson's Disease // Physiol. Rev. 2011. Vol. 91, №4. P. 1161–1218.

11. Di Fonzo A., Rohe C., Ferreira J. et al. A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease // *Lancet*. 2005. Vol. 365, №9457. P. 412–415.
12. Di Fonzo A., Wu-Chou Y., Lu C. et al. A common missense variant in the LRRK2 gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan // *Neurogenetics*. 2006. Vol. 7, №3. P. 133–138.
13. Funayama M., Hasegawa K., Kowa H. et al. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1 // *Ann. Neurol*. 2002. Vol. 51, №3. P. 296–301.
14. Funayama M., Li Y., Tomiyama H. et al. Leucine-rich repeat kinase 2 G2385R variant is a risk factor for Parkinson disease in Asian population // *Neuroreport*. 2007. Vol. 18, №3. P. 273–275.
15. Healy D.G., Falchi M., O'Sullivan S. et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study // *Lancet Neurol*. 2008. Vol. 7, №7. P. 583–590.
16. Keller M., Saad M., Bras J. et al. Using genome-wide complex trait analysis to quantify "missing heritability" in Parkinson's disease // *Hum. Mol. Genet*. 2012. Vol. 21, №22. P. 4996–5009.
17. Kim J., Lee J., Kim H. et al. The LRRK2 G2385R variant is a risk factor for sporadic Parkinson's disease in the Korean population // *Parkinsonism Relat. Disord*. 2010. Vol. 16, №2. P. 85–88.
18. Pchelina S.N., Yakimovskii A.F., Emelyanov A.K. Screening for LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in Russia: identification of a novel LRRK2 variant // *Eur. J. Neurol*. 2008. Vol. 15, №7. P. 692–696.
19. Wider C., Ross O., Wszolek Z. Genetics of Parkinson disease and essential tremor // *Curr. Opin. Neurol*. 2010. Vol. 23. P. 388–393.

REFERENCES

1. Akhmadeeva G.N., Khidiyatova I.M., Nasibullin T. Ret al. *Yakutskii meditsinskii zhurnal*. 2017. № 3 (59). pp. 5–9. (in Russian)
2. Illarioshkin S.N. *Etiologiya bolezni Parkinsona: novye predstavleniya i novye vyzovy. V kn.: Bolezn' Parkinsona i rasstroistva dvizhenii: rukovodstvo dlya vrachei po materialam III Natsional'nogo kongressa po bolezni Parkinsona i rasstroistvam dvizhenii (s mezhdunarodnym uchastiem)*. Moscow: ZAO «RKI Sovero press», 2014. pp. 5–13. (in Russian)
3. Levin O.S., Shindryaeva N.N., Dokadina L.V. In: *Ekstrapiramidnye rasstroistva: vchera, segodnya, zavtra. Sbornik statei*. Moscow, 2013. pp. 41–52. (in Russian)
4. Pchelina S.N., Emel'yanov A.K., Usenko T.S. *Molekulyarnaya biologiya*. 2014. Vol. 48, № 1. P. 3. (in Russian)
5. Sapronova M.R., Shneider N.A. *Nevrologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika*. 2014. №4. pp. 59–64. (in Russian)
6. Shadrina M.I., Illarioshkin S.N., Bagyeva G.Kh. et al. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. C.C. Korsakova*. 2007. Vol. 107, № 3. pp. 46–50. (in Russian)
7. Shul'skaya M.V., Zyrin V.V., Fedotova E.Yu. et al. In: *Bolezn' Parkinsona i rasstroistva dvizhenii: rukovodstvo dlya vrachei po materialam IV Natsional'nogo kongressa (s mezhdunarodnym uchastiem)*. Moscow, 2017. pp. 52–55. (in Russian)

Поступила 04.04.18.