

ОБЗОРЫ

DOI: 10.23868/201707012

КЛЕТочНЫЕ МОДЕЛИ, ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И КЛИНИЧЕСКАЯ ПРАКТИКА: СИНТЕЗ ЗНАНИЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ, ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНАВ.Р. Коваленко^{1,2,3}, Е.А. Хабарова⁴, Д.А. Рзаев⁴, С.П. Медведев^{1,2,3,5}¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия³ Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия⁴ Федеральный центр нейрохирургии, Новосибирск, Россия⁵ Национальный исследовательский Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия**Cellular models, genomic technologies and clinical practice: a synthesis of knowledge for the study of the mechanisms, diagnostics and treatment of Parkinson's disease**V.R. Kovalenko^{1,2,3}, E.A. Khabarova⁴, D.A. Rzaev⁴, S.P. Medvedev^{1,2,3,5}¹ Federal Research Centre of the Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia³ State Research Institute of Circulation Pathology, Novosibirsk, Russia⁴ Federal Center of Neurosurgery, Novosibirsk, Russia⁵ National Research Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

В настоящее время мы подошли к рубежу, когда молекулярная генетика и клеточная биология, обладая большим арсеналом данных и инструментов, позволяет нам оперировать информацией о последовательностях нуклеотидов целых геномов, редактировать нуклеотидные последовательности геномов лабораторных животных и культивируемых клеток человека, а также исследовать функции и взаимодействие генетических элементов в норме и патологии. Применение данных инструментов открывает огромные перспективы для изучения тяжёлых генетических патологий человека. В различных лабораториях мира проводят масштабные работы в этом направлении, осуществляя поиск связей между генетическими элементами и заболеваниями, используя новейшие технологии редактирования генома и репрограммирования соматических клеток к плюрипотентному состоянию. Среди наиболее прогрессивно развивающихся направлений исследований находится изучение нейродегенеративных заболеваний. В данном обзоре мы рассмотрели перспективы и проблемы применения новых методов и технологий клеточной биологии, генетики и геномики для изучения молекулярно-генетических основ патогенеза болезни Паркинсона.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, моделирование заболеваний, редактирование геномов, CRISPR/Cas9, α -синуклеин.

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой хроническое, неуклонно прогрессирующее заболевание головного мозга. Это второе по частоте встречаемости (после болезни Альцгеймера) нейродегенеративное заболевание, связанное с нарушением баланса тормозных и активирующих взаимодействий между подкорковыми структурами головного мозга (рис. 1).

Nowadays we approached the turn, when the molecular genetics and the cell biology with its extensive baggage of methods and data, allow us to work with information about nucleotide sequences of whole genomes, to edit the nucleotide sequence of the genomes of laboratory animals and cultured human cells and also explore functions and interactions of genetic elements in health and in disease. The use of these instruments opens up huge possibilities for the study of severe human genetic abnormalities. In various laboratories around world an extensive work is carried out in this area by searching links between genetic elements and diseases, using the latest technology of genome editing and reprogramming somatic mature cells to a pluripotent stem condition. The most progressively developing area of research is the study of neurodegenerative diseases. In this review we discussed about possibilities and problems of using new techniques and instruments of cell biology, genetics and genomics in studying molecular and genetic basis of the pathogenesis of Parkinson's disease.

Keywords: Parkinson's disease, disease modeling, editing genomes, CRISPR/Cas9, alpha-synuclein.

Ведущим морфологическим субстратом БП является прогрессирующая дегенерация дофаминпродуцирующих пигментных нейронов в компактной части черной субстанции среднего мозга и формирование в гибнущих клетках α -синуклеин-позитивных цитоплазматических включений — телец Леви [1]. Это сопровождается хронической дисфункцией дофаминергических путей, снижением уровня дофамина в эффекторных зонах мозга.

e-mail: medvedev@bionet.nsc.ru

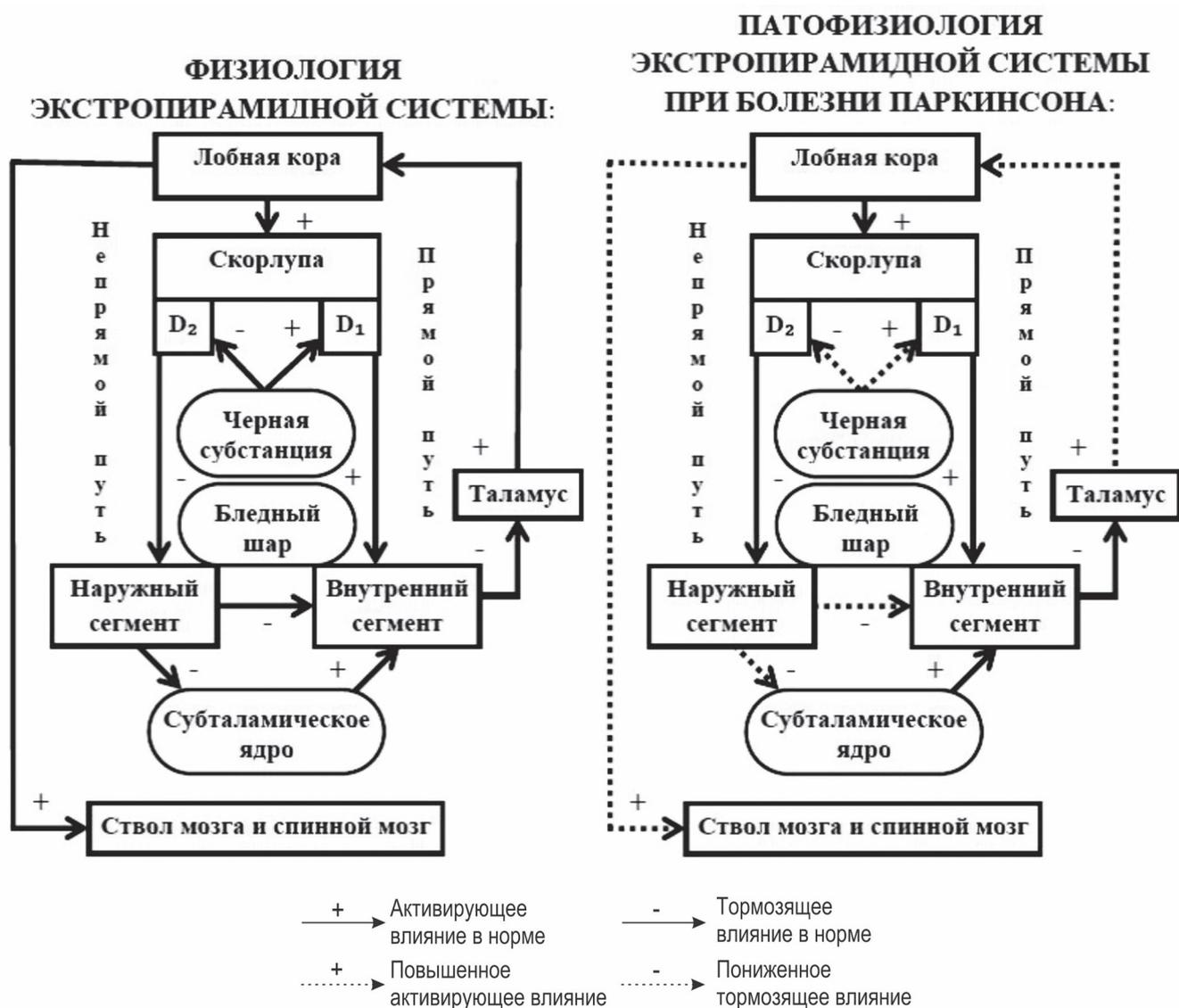


Рис. 1. Схема функционирования базальных ганглиев в норме и при паркинсонизме

Дофамин имеет несколько рецепторов (D1- и D2-рецепторы), расположенных не только в экстрапирамидной системе, но и в различных участках ЦНС, что обеспечивает клиническое разнообразие симптомов при дисфункции дофаминергических путей. Пресинаптические рецепторы дофамина играют роль в его синтезе и высвобождении в синаптическую щель, а постсинаптические рецепторы дофамина захватывают его, обеспечивая межклеточное взаимодействие [2].

История вопроса

Направление исследований в области знаний о БП можно отследить, обратившись к истории и выделив несколько значимых этапов, меняющих понимание и представление о проблемах и перспективах исследования.

Первые болезнь была описана Джеймсом Паркинсоном в 1817 г. Он же сделал вывод об основных клинических чертах: брадикинезия, тремор покоя, ригидность и поструральная неустойчивость. Однако кроме моторных проявлений отмечаются и немоторные симптомы, такие как: депрессия, нарушения сна и памяти [3].

Затем Фриц Генрих Леви обнаружил и описал новые патогистологические структуры. Он исследовал аутопсийный материал больных, умерших от дрожательного паралича, и в 1912 г. публикует результаты патогистологического анализа 25 человек с диагнозом БП [4]. В ходе работы им были описаны специфические внутриклеточные зозинофильно окрашенные тельца в различных анатомических структурах мозга: ядрах таламуса, клетках блуждающего нерва, бледном шаре. Впоследствии они были названы тельцами Ф.Г. Леви. Его данные подтверждаются современными методами, более того, тельца Леви были найдены и в коре мозжечка [5], и в голубом пятне [6]. Однако Леви не придал найденным образованиям особого значения, не найдя им места в патогенезе дрожательного паралича. В этом нет ничего удивительного, здесь настораживает именно распространённость процесса при вполне конкретных чётких топических нарушениях в структуре мозга. Связаны ли эти вещи, было непонятно.

И только на следующем этапе благодаря работам Константина Николаевича Третьякова была ограничена та анатомическая область, деструкция и дисфункция которой приводит к ригидности и тремору. Сравнительный патогистологический анализ голов-

ного мозга пациентов с паркинсонизмом, вследствие летаргического энцефалита Экономо, и пациентов без диагноза энцефалит, позволил выявить связь между дегенеративными процессами в чёрной субстанции головного мозга и БП [3]. После многочисленных подтверждений данного предположения, в 1919 г. К. Третьяков сформулировал теорию, связывающую паркинсонизм с определенной анатомической структурой в головном мозге — *substantia nigra* [3]. Только после этого в чёрной субстанции головного мозга были выявлены те самые тельца Леви, о которых упоминалось выше. Структуры, идентичные тельцам Леви встречаются также в отростках, которые называются Леви нейриты. Выявление их в компактном веществе чёрной субстанции в атипичном материале является основным патогистологическим признаком БП, т.е. присутствие телец Леви в других структурах головного мозга не связывают с заболеванием, в то время как их наличие в чёрной субстанции является основой для подтверждения диагноза *post mortum*. При БП поражается не только чёрная субстанция, происходит дегенерация нейронов других структур, однако, центральная роль отводится исключительно чёрной субстанции.

Четвертым этапом истории изучения БП стало открытие связи мутации A53T в гене *PARK1 (SNCA)*, кодирующем белок α -синуклеин, и раннего дебюта БП [7]. Практически сразу после этого было показано, что α -синуклеин является основным компонентом телец Леви и находится в агрегированном состоянии [8]. Было обнаружено, что накопление α -синуклеина также характерно для некоторых других нейродегенеративных заболеваний, таких как деменция с тельцами Леви [9] и мультисистемная атрофия [10]. В последнем случае накопление α -синуклеина обнаруживали не только в нейронах, но и в клетках глии. Это позволило выделить группу так называемых α -синуклеинопатий и запустило серию исследований этого белка.

Клиническая практика

Кроме недостаточной изученности механизмов возникновения заболевания, существует также проблема несовершенства диагностических критериев. Диагноз БП основывается на клинико-диагностических критериях Банка Головного Мозга Общества БП Великобритании [11]:

1) наличие брадикинезии и, по крайней мере, одного из следующих симптомов — тремора, ригидности или постуральной неустойчивости;

2) наличие критериев, подтверждающих диагноз БП: одностороннее начало, тремор покоя, прогрессирующий характер заболевания, стойкий эффект на прием препаратов леводопы;

3) отсутствие критериев, исключаящих БП (отсутствие в анамнезе повторных инсультов, черепно-мозговых травм, энцефалита, окулогирных кризов, приема нейролептиков; отсутствие в клинической картине мозжечковых симптомов, надъядерного паралича, наличия опухоли и сообщающейся гидроцефалии, ранней выраженной прогрессирующей вегетативной недостаточности и деменции).

Симптомы БП в дебюте асимметричны и характеризуются обязательным сочетанием гипокинезии с ригидностью и(или) тремором покоя и значимым терапевтическим откликом на дофаминергические препараты.

Таким образом, несмотря на то, что прошло почти 200 лет с момента первого клинического описания заболевания, а также большой прогресс в понимании механизмов патогенеза заболевания, критериями диагноза остаются те же признаки, что были описаны в 1817 г.

Метаболический путь синтеза дофамина состоит из следующих этапов: фенилаланин — тирозин — L-дофамин — дофамин. Главный фермент, обеспечивающий переход L-дофамина в дофамин — докарбоксилаза ароматических аминокислот (ДАА). На сегодняшний день самым эффективным противопаркинсоническим средством, влияющим на все симптомы БП, остается леводопа (L-дофамин, 3,4-дигидроксифенилаланин) [12, 13]. В отличие от дофамина, леводопа способна проходить сквозь гемато-энцефалический барьер (ГЭБ) [2]. Она захватывается окончаниями сохранившихся нигростриарных нейронов и, подвергаясь в них докарбоксилации, превращается в дофамин, который накапливается в пресинаптических пузырьках и выделяется в синаптическую щель, поддерживая адекватное функциональное состояние нейронов полосатого тела. Однако докарбоксилазы ароматических аминокислот (ДАА) есть не только в центральной, но и периферической нервной системе. Докарбоксилация леводопы в периферических тканях приводит к снижению её биодоступности для головного мозга, а также к массе нежелательных последствий, таких как тошнота, рвота, артериальная гипотензия [14]. В настоящее время леводопа применяется исключительно совместно с ингибиторами ДАА (карбидопа или бензеразид).

У большинства больных с БП даже умеренные дозы леводопы вызывают значительное уменьшение основных симптомов заболевания [13]. С течением времени, однако, эффективность леводопы снижается. Это связано с несколькими аспектами:

1) по мере прогрессирования патологического процесса, нарушения начинают касаться других моторных областей головного мозга или их связей, что может сыграть роль в ослаблении действия леводопы [12];

2) снижение эффективности леводопы также связывают с уменьшением концентрации фермента, обеспечивающего конвертацию леводопы в дофамин — ДАА [15];

3) по мере дегенерации нигростриарных терминалей в стриатуме снижается их способность накапливать дофамин в везикулах и плавно высвобождать его в синаптическую щель. Недофаминергические нейроны, в которых содержится ДАА, синтезируют дофамин из леводопы, но при этом не имеют механизмов для регуляции его выделения. Вновь полученный дофамин из экзогенной леводопы не накапливается и неконтролируемо в больших количествах высвобождается. Таким образом, выброс дофамина становится импульсным, напрямую зависящим от концентрации леводопы в крови, и стимуляция дофамина из тонической при физиологическом состоянии превращается в пульсирующую [14].

Если затормозить патологический процесс в *substantia nigra* или вовсе остановить его пока не представляется возможным, то воздействовать на концентрацию ДАА можно с помощью геномных технологий. Для восстановления адекватного уровня ДАА в полосатом теле и, как следствие, для усиления ответа на лечение леводопой, был разработан

вектор AAV2-hAADC, содержащий кДНК ДАА человека, который протестировали на обезьянах [16] и крысах [15]. БП моделировали путём введения нейротоксина 6-гидроксидопамина. В эксперименте с обезьянами был поставлен вопрос о дозировке AAV-hAADC для достижения терапевтического эффекта и значимого улучшения действия леводопы. По итогам инъекции AAV-hAADC от 0 до 55 единиц не показали должного эффекта, тогда как дозы от 55 до 500 единиц существенно повышали восприимчивость к терапии леводопой [16]. Исследование, проведенное на крысах, являлось продолжением экспериментов с обезьянами. Авторы полагают, что сняв лимит с фермента ДАА избавят пациентов от необходимости повышать дозу леводопы по мере прогрессирования заболевания. Кроме того, был проведен сравнительный анализ не только с вектором AAV2-hAADC и контролем — инъекция GFP, но и с применением карбидопы. Исследования показали, что при отсутствии карбидопы, ингибитора ДАА, эффективность леводопы крайне низка вне зависимости от инъекции AAV2-hAADC, в то время как при одновременном применении леводопы и карбидопы, показатели у животных, которым сделали инъекцию AAV2-hAADC, выше, чем у контрольных (инъекция GFP). Максимальный терапевтический эффект был получен при соотношении леводопы и карбидопы 4 к 1 [15].

После тестирования вектора AAV2-hAADC на животных была проведена первая фаза клинических испытаний, в которой приняли участие 10 человек, получавшие инъекции как низких, так и высоких доз AAV2-hAADC билатерально в скорлупу [17]. За 4 года наблюдений была отмечена стабильная экспрессия трансгенов и их безопасность для всех испытуемых, однако с течением времени показатели все же медленно ухудшались. Авторы подчеркнули, что необходимо использование более высоких доз вектора и дальнейшие контролируемые испытания этой методики [18].

К сожалению, разработанные различные пролонгированные формы леводопы, как оказалось, обладают меньшей биодоступностью, отсроченным началом действия, и, как следствие, пациентам необходимы большие суточные дозы в сравнении со стандартными лекарственными формами [19].

К основным противопаркинсоническим средствам также относятся:

— агонисты дофаминовых рецепторов: препараты этой группы непосредственно взаимодействуют с постсинаптическими рецепторами стриатума (преимущественно D2 — рецепторами), минуя дофаминергические нейроны. При этом воспроизводится эффект, сходный с действием дофамина, но степень его выраженности меньше, чем после приема леводопы. Агонисты дофаминовых рецепторов имеют длительный период полувыведения и более физиологично в сравнении с другими группами препаратов влияют на дофаминовые рецепторы [20];

— препараты группы амантадина способствуют увеличению высвобождения дофамина из пресинаптических окончаний, оказывают умеренный эффект в отношении гипокинезии и ригидности, мало воздействует на тремор, однако являются эффективным средством в профилактике и лечении дискинезий [21];

— ингибиторы ферментов, участвующих в катаболизме дофамина, используют для уменьшения разрушения дофамина Большая часть дофамина в стри-

туме метаболизируется моно-аминоксидазой типа В (МАО-В), частично — катехол-о-метилтрансферазой (КОМТ). Применение ингибитора МАО-В селегилина и ингибитора КОМТ толкапона или знтакапона способствуют уменьшению распада дофамина и повышению его концентрации в мозге [22].

Кроме терапевтических методов лечения БП существуют нейрохирургические, включающие глубокую стимуляцию подкорковых структур головного мозга, и деструктивные вмешательства.

Эффективность лечения во многом зависит от правильно выбранного кандидата для хирургии. Решение о том, какой конкретно тип операции будет рекомендован пациенту, должно быть основано на сбалансированном анализе показаний к хирургии, едином мнении невролога и нейрохирурга, наряду с активным участием пациента и его семьи. В каждом случае выбор должен осуществляться индивидуально в соответствии с симптоматикой и индивидуальными потребностями пациента [23].

Многочисленные исследования показали, что у пациентов с атипичным паркинсонизмом, таким как надъядерный паралич, мультисистемная атрофия, деменция с тельцами Леви, сосудистый паркинсонизм, нейрохирургическое лечение неэффективно [24]. Более того, степень тяжести симптомов паркинсонизма может значительно увеличиться после проведенной операции. Поэтому правильный диагноз БП является самым важным критерием отбора на хирургическое лечение [11]. Это довольно интересный факт, если предполагать, что происхождение БП так же связано с α -синуклеином, как и вышеперечисленные «атипичные формы».

Таким образом, БП — тяжелое заболевание, терапия которого несовершенна. Не только в России, но и в мире в целом, наблюдается тенденция к увеличению продолжительности жизни. В связи с этим нарастает актуальность в совершенствовании медицинских технологий, терапии патологий среднего и старшего возраста. Наиболее проблематичными являются заболевания, фенотип которых трудно смоделировать, а потому скорость прогресса в понимании их патогенеза, соответственно и разработки новых терапевтических средств, довольно низка. БП — одно из таких заболеваний. Развивающиеся технологии в области биомедицины находят решение проблемы изучения БП, позволяя осуществлять поиск мишеней для терапии и новые лекарственные средства.

Геномные технологии

В последнее десятилетие произошёл прорыв в развитии таких геномных технологий как секвенирование и редактирование генома, благодаря которым возможно не только заполнять пробелы в понимании функций, назначения и структуры некоторых генов, но также и манипулировать ими, используя эту информацию. Это инструменты, расширяющие наши возможности в получении модельных организмов, клеточных моделей и внедрении достижений биомедицины в клиническую практику.

Важную роль играют развивающиеся технологии секвенирования ДНК, которые включают определение нуклеотидных последовательностей геномов, секвенирование экзонов и кодирующих областей групп клинически значимых генов, а также секвенирование транскриптомов. Так, с помощью секвенирования нового поколения в Китае были проанализиро-

ваны данные 237 человек со спорадической формой БП, 143 мужчин и 94 женщин [25]. Прицельно исследовали 48 генов-кандидатов и выявили четыре новые несинонимичные замены и шесть ранее аннотированных. Однако секвенированием по Сэнгеру были подтверждены лишь аннотированные. Тем не менее, авторы подчеркивают, что ранее не проводилось подобных исследований с целью найти некоторые редкие, но функционально значимые изменения в спорадических вариантах развития БП. В 2013 г. с помощью полноэкзомного секвенирования данных 213 пациентов с диагнозом БП и 272 условно здоровых человек как контрольной группы, были выявлены некоторые определенные несинонимичные нуклеотидные замены в генах *VPS35* и *EIF4G1*, которые связывают с возникновением БП [26]. В гене *VPS35* были обнаружены замены р.Р316S, р.У507F, р.Е787K, ни одна из которых не наблюдалась в контрольной группе. В гене *EIF4G1* было определено восемь несинонимичных замен, среди которых была одна известная ранее (р.Р1205H), и все они, что интересно, локализируются в непосредственной близости к функциональным областям РABP и *EIF4E* гена *EIF4G1* [26]. Это позволяет предположить, что именно эти области играют значимую роль в функции белка, кодируемого *EIF4G1*. С другой стороны, высокая частота замен в этом районе может лишь свидетельствовать о его высокой толерантности к генетической изменчивости.

Другой, значимой для раскрытия функций генов и регуляторных элементов генома технологией является редактирование генома, которое включает в себя несколько инструментов. Одним из этих инструментов являются программируемые нуклеазы ZNF (Zinc-finger nucleases). С помощью ZNF из клеток нейробластомы SH-SY5Y и HEK293 были получены клеточные линии, экспрессирующие слитый с GFP или люциферазой α -синуклеин [27]. Данные модельные системы авторы предлагают использовать как платформу для изучения α -синуклеина и поиска новых лекарственных препаратов. Для создания модели БП на эмбриональных стволовых клетках человека (ЭСК), используя катализируемую ZFN го-

мологичную рекомбинацию, в клетки были внесены мутации A53T (G209A) и E46K (G188A) [28]. В этой же работе были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) из фибробластов пациента с БП, а затем, также с помощью ZFN-опосредованной гомологичной рекомбинации была исправлена мутация A53T (G209A).

Относительно недавно была разработана система направленного редактирования геномов – CRISPR/Cas9. Данный инструмент отличается от ZFN более высокой эффективностью и низкими временными и финансовыми затратами на проведение экспериментов. Благодаря технологии CRISPR/Cas9 появилась возможность избежать длительного и дорогостоящего процесса получения определенной линии животных моделей [29] (рис. 2). Среди животных моделей используют два подхода: линии животных, несущих определенную мутацию, ассоциированную заболеванием или целенаправленная дегенерация дофаминергических нейронов инъекцией нейротоксина. Фенотип последнего варианта тяжелее, чем первого. Второй вариант: использовать ИПСК. Чтобы их получить необходимо репрограммировать клетки пациента, страдающего болезнью Паркинсона. Благодаря последующей дифференцировке клеток в дофаминергические нейроны, можно получить «пациента в чашке Петри», исследовать морфологию и функционирование клеток. Можно использовать различные приёмы: создание стресса, путём добавления токсина, или создание условий ускоренного старения клеток (чтобы оценить их фенотип при старении). Двумя группами исследователей уже успешно были получены минисвиньи с нокаутами генов *PARK6* (*PINK1*) и *PARK2* (*Parkin*) [30], а также *PARK7* (*DJ-1*), *PARK6* (*PINK1*) и *PARK2* (*Parkin*) [31].

С помощью CRISPR/Cas9 были получены данные относительно спорадических случаев БП: были проанализированы различные варианты гена *SNCA* и обнаружено, что большинство вариаций связаны с некодирующей частью, энхансером, увеличивающим экспрессию гена путём связывания с транскрипционными факторами [32]. Несмотря на то, что *SNCA* является локусом с самым высоким

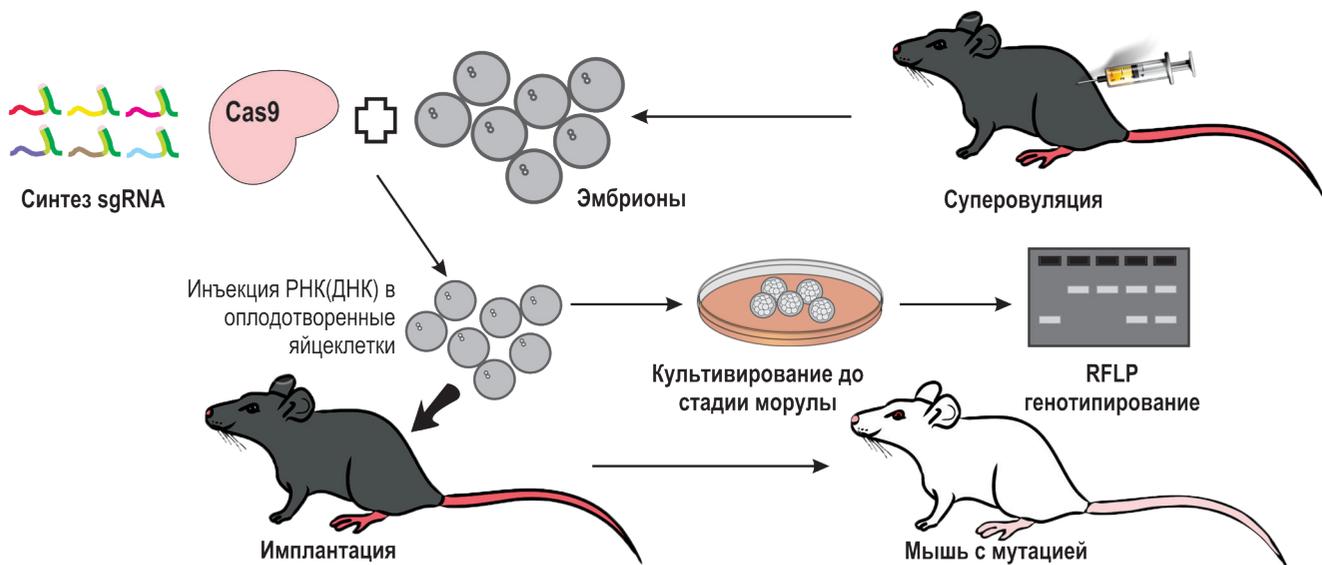


Рис. 2. Схема моделирования болезни Паркинсона с помощью системы CRISPR/Cas9 на мышах

риском для спорадической БП [33], при исследовании спорадических случаев не было выявлено никаких изменений в кодирующей последовательности [34]. Это позволило предположить, что дело лишь в увеличении уровня экспрессии этого гена [35]. В попытке проверить гипотезу, что энхансер будет влиять на экспрессию генов и специфические SNPs приведут к изменению уровня экспрессии, использовали CRISPR/Cas9 [32]. В ЭСК человека был удалён участок энхансера, содержащий два ассоциированных с риском развития БП SNPs (rs356168 и rs3756054). Гомозиготная линия ЭСК с удалённым участком стала контролем, также были созданы четыре гетерозиготные линии (вариации двух ассоциированных с риском SNP). Впоследствии клетки были подвергнуты дифференцировке в нейральном направлении и произведена количественная ПЦР для оценки уровня экспрессии мРНК α -синуклеина. Нейроны, несущие аллель G в rs356168, имели значимо более высокий уровень экспрессии α -синуклеина по сравнению с нейронами контроля и нейронами, несущими аллель A в том же SNP сайте [32].

Подтверждение полученных данных, исследование молекулярных механизмов, с помощью которых

продукты генов участвуют в патологических процессах, редактирование обнаруженных мутаций *in vitro* и *in vivo* невозможно без построения адекватных моделей. И, наконец, именно редактирование генома позволяет нам исправлять мутации на клеточных моделях, подтверждать их значимость и разрабатывать потенциально новые подходы к терапии.

Модели для изучения болезни Паркинсона

Моделирование заболевания занимает центральное место в «круговороте» поиска эффективных терапевтических средств (рис. 3).

На настоящий момент среди клеточных моделей наиболее приоритетной является модель на основе ИПСК, так как позволяет использовать клетки пациентов, страдающих БП. Исследуя на клетках молекулярные основы патогенеза заболевания, можно подобрать мишени для терапии, изучить их поведение на модельных животных, подтвердить их роль, а затем вести подбор лекарственного средства, демонстрируя его эффективность и преимущества на клеточных, животных моделях, а затем переходить к клиническим испытаниям на людях.

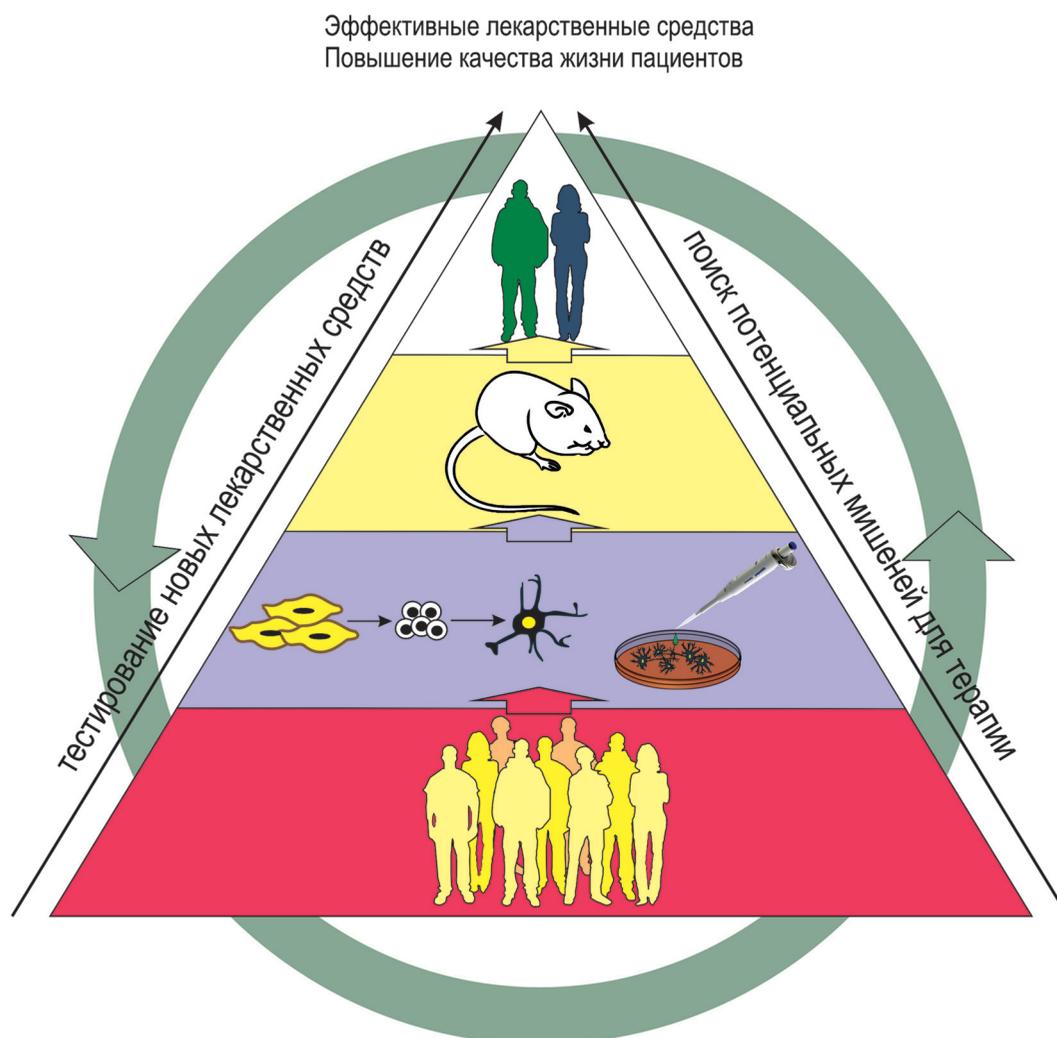


Рис. 3. Система поиска потенциальных мишеней для терапии заболевания и тестирования новых лекарственных средств с помощью получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток из клеток пациентов, получения релевантных типов клеток и создания клеточной модели заболевания

Модельные организмы

Для моделирования БП успешно используют мух-дрозофилл *Drosophila melanogaster* [36–38] и нематод *Caenorhabditis elegans* [39, 40]. Были созданы трансгенные линии мух, содержащих мутантный (A30P, A53T) и немутантный варианты α -синуклеина человека [37]. Была доказана потеря с возрастом небольшой субпопуляции дофаминергических нейронов у дрозофил с мутантным α -синуклеином. Кроме того, были обнаружены агрегаты α -синуклеина, которые авторы сопоставляют с тельцами Леви. Время появления включений α -синуклеина в мозге мушки зависело от уровня экспрессии α -синуклеина. Включения появлялись в 20–30-дневном возрасте, в более молодом возрасте картина иммуногистохимического окрашивания выглядела «диффузной», без включений. Особи, несущие мутацию SNCA^{A30P} раньше, чем мухи дикого типа или SNCA^{A53T}, теряли способность двигаться вверх по стеклу. Дегенерация также касалась сетчатки глаза [37]. Используя дрозофил, был исследован ген *LRRK2*. Для создания трансгенных мушек, экспрессирующих дикий тип *LRRK2* человека или *LRRK2*^{G2019S} применяли систему GAL4/UAS [36]. Были зафиксированы: селективная потеря дофаминергических нейронов, нарушение опорно-двигательной функции и ранняя смерть. Терапия леводопой улучшила фенотип, но не предотвратила потерю дофаминергических нейронов [36].

В исследовании на нематодах был использован штамм, который экспрессирует зеленый флуоресцентный белок именно в дофаминергических нейронах (BZ555) и трансген, экспрессирующий α -синуклеин человека в мышечных клетках (OW13), чтобы протестировать терапевтическое действие *l*-бутилиден-фтилада [40]. Было показано снижение дегенерации дофаминергических нейронов, уменьшение накопления α -синуклеина. Авторы утверждают, что этот препарат может быть использован для усиления эффекта леводопы [40].

В случае моделирования БП на млекопитающих (чаще всего на мышах и крысах) используют два подхода: или разрушают прицельно дофаминергические нейроны среднего мозга путём введения нейротоксинов, или используют мутантные линии животных, несущих ту или иную мутацию, ассоциированную с БП. Из нейротоксинов в основном применяют

МРТП (метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) или 6-гидроксидопамин [41].

Ключевой особенностью моделей на лабораторных грызунах является возможность оценить поведенческие фенотипы, особенно в нейротоксических моделях. На некоторых животных моделях наследственной формы БП показана агрегация α -синуклеина, дисфункция митохондрий, некоторый дефицит передачи дофамина и поведенческие отклонения [41]. Но нейротоксические модели не воспроизводят физиологическую ситуацию при БП, а получение трансгенных линий мышей медленный и дорогостоящий процесс, который, в конечном счёте, не позволит отклониться от изучения одной конкретной мутации, чтобы сделать некие обобщающие выводы, и также не поможет разобраться в том, что происходит на клеточном уровне.

Однако, грамотное использование имеющихся средств и верное направление формирования гипотез, позволяют выявить новую, необходимую информацию, которую было бы неплохо проверить на клеточных моделях. В частности, накопление α -синуклеина в терминальных отростках нейрона позволило предположить, что он как-то связан с механизмами выделения нейромедиаторов. Экзоцитозное высвобождение нейромедиатора в синаптическую щель осуществляет так называемый SNARE-комплекс. Это очень большая группа белков, которая делится на две подгруппы: белки везикул (*v*-SNARE) и белки клеточной мембраны или мембраны органеллы (*t*-SNARE). Все белки объединяет наличие одного и того же домена, называемого SNARE-мотив, который способен к образованию прочной, но обратимой сцепке [42]. Часть белков изучена благодаря тому, что они являются мишенями опасных токсинов, приводящих к ботулизму или столбняку. Синтаксин и SNAP-25 являются белками клеточной мембраны, а белок синаптобrevин находится на поверхности везикулы. Для осуществления экзоцитоза они формируют комплекс [42]. Ценные сведения были получены в результате объёмной работы J. Вигге и соавт. (2010) [43]. Они показали на мышах, что α -синуклеин непосредственно способствует сборке SNARE-комплекса посредством неферментативного механизма, одновременно связываясь с фосфолипидами мембран (через N-конец) и с синаптобrevином-2 (через C-конец) (рис. 4).

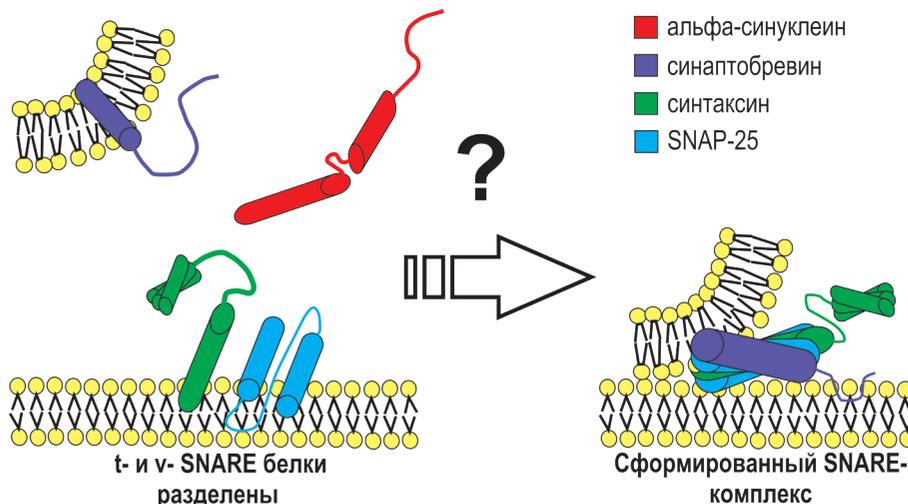


Рис. 4.

Схема формирования SNARE-комплекса. Известно, что синаптобrevин — белок на поверхности мембраны везикулы, в то время как белки синтаксин и SNAP-25 находятся на поверхности клеточной мембраны. Формирование комплекса между ними приводит к экзоцитозу содержимого везикулы. Конкретная роль α -синуклеина до конца неизвестна, однако, предполагают, что он также находится на поверхности везикулы, как и синаптобrevин и способствует формированию SNARE-комплекса

Кроме того, исследуя назначение синуклеинов, они осветили такой интересный факт: фенотип мышей с нокаутом всех синуклеинов (α -, β - и γ -) напоминает медленное прогрессирование нейродегенеративных заболеваний [43]. Полученные данные согласуются с предположением, что α -синуклеин вовлечен в механизмы нейродегенерации.

Клеточные модели

Для моделирования БП на клетках используют различные культуры, среди которых клеточная линия HEK293 [27, 44, 45], линия HeLa [45], клетки нейробластомы SH-SY5Y [27]. Преимущества использования таких клеточных линий заключаются в простоте культивирования этих клеток, дешевизне, лёгкости трансгенеза, а также в том, что это клетки человеческого происхождения. Основными недостатками являются измененный кариотип и генотип, а также то, что они не относятся к релевантным типам клеток.

Моделью также могут послужить клетки пациентов, страдающих БП. Чаще всего используют фибробласты [46, 47], которые не являются релевантным типом клеток, но имеют генотип конкретного пациента.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) обладают плюрипотентностью, поэтому могут быть дифференцированы в нейральном направлении и таким образом представляется возможность получить релевантный тип клеток для исследований [28, 48]. Создание моделей наследственных форм заболевания на основе ЭСК требует манипуляций с их геномами, что сопряжено с определенными техническими трудностями. На сегодняшний день существует определенный набор протоколов, которые позволяют осуществлять направленную дифференцировку ЭСК в дофаминергические нейроны. Показано, что экспрессия генов *Lmx1a* [49], *Lmx1b* [50], *Nurr1* [51] и *Pitx3* [52] в ЭСК стимулирует их дифференцировку в дофаминергическом направлении, эффективность которой составляет около 18% [50]. Была предпринята попытка получить модель БП путём переноса ядра фибробластов мыши, несущей мутацию, в ооциты, с целью последующего выделения и анализа ЭСК на стадии 4-клеточного зародыша. Мышь сохранила делеции в гене *Pitx3* и продемонстрировала селективную потерю дофаминергических нейронов в *substantia nigra* [48]. Полученные ЭСК были проанализированы на способность дифференцироваться в нейральном направлении.

Отличной заменой ЭСК при моделировании заболеваний человека, в том числе и БП, являются ИПСК. Основное преимущество данных клеток заключается в том, что они, как и ЭСК, плюрипотентны и обладают свойством самообновления в культуре, но при этом могут быть получены из соматических клеток пациента любого возраста. Начало было положено в 2008 г., когда были получены ИПСК от пациентов с БП, мышечной дистрофией Дюшена, диабетом

первого типа, синдромом Дауна и болезнью Гентингтона [53]. Важным является то, что на моделях нейронов, которые образуются при дифференцировке ИПСК, можно изучать молекулярные механизмы патогенеза заболевания, патофизиологию, проводить поиск новых мишеней для лекарственной терапии и маркёров патологии. При моделировании заболевания, как правило, используют биоматериал пациентов, имеющих диагноз БП. Среди способов репрограммирования соматических клеток в ИПСК чаще всего используют так называемый «коктейль Яманаки», включающий в себя гены, кодирующие транскрипционные факторы OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC. Затем, ИПСК подвергают направленной дифференцировке в нейральном направлении. В исследованиях работают с нейральными стволовыми клетками [54, 55], общим пулом полученных в результате дифференцировки нейронов [56, 57], клетками, положительными по экспрессии тирозингидроксилазы (дофаминергические нейроны) [58-61]. Исследуют морфологию нейронов и их электрофизиологическую активность в нормальных условиях и в стрессовых, при добавлении некоторых токсинов. Есть исследования, направленные на оценку «старения» нейрона, на выявление изменений которые сопровождают дегенерацию нейронов от здоровых доноров и от доноров с патологией [41]. Благодаря новейшим методикам редактирования генома, появилась возможность исследовать мутации, ассоциированные с заболеванием, исправляя их на стадии фибробластов и затем получая релевантный тип клеток через ИПСК или на стадии непосредственно нейронов [62, 63]. Сочетание в исследовании получения релевантного типа клеток и животных моделей позволяет изучать возможности заместительной клеточной терапии [64]. Данные, полученные на клеточных моделях БП в случаях наследственных и спорадических форм заболевания, рассмотрены ниже в контексте каждого отдельного гена, ассоциированного с БП.

Гены, ассоциированные с болезнью Паркинсона

По данным последних исследований мутации генов, ассоциированных с БП, приводят к некоторым фенотипическим проявлениям (табл. 1):

- 1) накоплению α -синуклеина;
- 2) морфологическим изменениям нейрона (уменьшение длины и количества отростков);
- 3) окислительному стрессу (уменьшение митохондриального дыхания, увеличение уровня моноаминоксидазы-B, повышенная подверженность воздействию клеточным стрессорам);
- 4) митохондриальной дисфункции;
- 5) дефекту аутофагии;
- 6) нарушению архитектуры ядра, его оболочки;
- 7) дисфункции синапсов.

Тип наследования мутаций различных генов неодинаков (табл. 2).

Таблица 1. Фенотипические проявления мутаций в генах, ассоциированных с болезнью Паркинсона. Исследования на клеточных моделях, основанных на ИПСК

Ген	Мутация	Клеточная модель	Результаты	Ссылки
<i>PARK8</i> (<i>LRRK2</i>)	G2019S, R1441G	Фибробласты репрограммированы ретровирусной доставкой ОКSM в ИПСК. Использовали 2 протокола дифференцировки: в нейроны и их предшественники (нейральные прогениторные клетки)	1. Повышенное количество поврежденной митохондриальной ДНК в обоих вариантах мутантных нейронов и нейрональных предшественниках (но не в фибробластах и не в ИПСК) 2. Коррекция мутации G2019S с помощью ZFN исправила фенотип	[54]
	G2019S	ИПСК получены ретровирусной доставкой ОКС. Дифференцировали до дофаминергических нейронов	1. Накопление α -синуклеина 2. Активность ШОА повышена в незрелых нейронах и снижена в зрелых	[60]
		Фибробласты FFF-028 репрограммированы ретровирусной доставкой ОКС в ИПСК. Дифференцировка в нейрональные стволовые клетки	1. Повышен уровень окислительного стресса 2. Прогрессирующая дегенерация ядра 3. Сниженный уровень аутофагии 4. Нарушения нейрогенеза и дифференцировки в зрелые нейроны 5. Коррекция мутации G2019S исправила фенотип	[55]
		ИПСК получены из фибробластов кожи ретровирусной доставкой ОКSM. Дифференцировка в дофаминергические нейроны	1. Накопление α -синуклеина; 2. Высокая экспрессия MAPT и накопление белка TAU 3. Повышен уровень окислительного стресса 4. Сниженный уровень аутофагии 5. Изменение морфологии: снижены число и длина отростков нейронов 6. Повышенная активация ERK 7. Коррекция мутации G2019S исправила фенотип	[61]
		Фибробласты пациента с БП были репрограммированы ретровирусной доставкой ОКSM в ИПСК. Сокультивирование дофаминергических нейронов с астроцитами PA6	1. Накопление α -синуклеина 2. Уязвимость к химическим стрессорным агентам (перекись, 6-OHDA, MG-132)	[59]
<i>PARK6</i> (<i>PINK1</i>)	C1366T, V170G	Фибробласты были репрограммированы ретровирусной доставкой ОКSM в ИПСК. Дифференцировка в дофаминергические нейроны	1. Повышенный митохондриальный биогенез 2. Снижение привлечения паркина к поврежденной митохондрии 3. Нарушен клиренс поврежденных митохондрий	[115]
	V170G	Фибробласты были репрограммированы ретровирусной доставкой ОКSM в ИПСК. Дифференцировка в дофаминергические нейроны	1. Утрата (инициированной деполяризацией мембраны митохондрии) убиквитинизации митофузина-2 и паркина	[114]

Продолжение таблицы 1

Ген	Мутация	Клеточная модель	Результаты	Ссылки
<i>PARK8</i> (<i>LRRK2</i>) и <i>PARK6</i> (<i>PINK1</i>)	LRRK2/ LRRK2/ PINK1 (G2019S/ R1441C/ Q456X)	Фибробласты репрограммированы ретровирусной доставкой ОКSM в ИПСК. Дифференцировка в пул из CD56+ нейрональных клеток, нейронов и нейральных стволовых клеток	1. Повышенная уязвимость к большому спектру клеточных стрессоров, этот фенотип исправляется при добавлении ингибитора LRRK2, антиоксиданта CoQ и с помощью рапамицина. Клетки, с мутациями в PINK1, более подвержены окислительному стрессу, чем клетки с мутациями в LRRK2 2. Нарушение митохондриального дыхания	[56]
<i>PARK1</i> (<i>SNCA</i>)	A53T	Полученные с помощью лентивирусной доставки ОКSM ИПСК были дифференцированы в нейроны	1. Нитрозативный стресс 2. Снижена ЭПР-ассоциированная деградация ГЦазы и никастрина 3. NAB2 смягчает токсичность α -синуклеина, корректируя нитрозативный стресс	[96]
		Полученные с помощью лентивирусной доставки ОКSM ИПСК были дифференцированы в A9 дофаминергические нейроны	1. Патологическая олигомеризация α -синуклеина и его накопление 2. Уязвимость к воздействию токсинов 3. Индуцированные токсином активные формы кислорода и NO приводят к снижению активности антиапоптотического транскрипционного фактора MEF2C 4. Повышен базальный уровень NO 5. Снижена транскрипция PGC α , частично исправляется ингибирование NO-синтазы 6. Активация MEF2C восстанавливает нормальную экспрессию PGC α и устойчивость к токсинам	[97]
	Трипликация	Фибробласты репрограммированы ретровирусной доставкой ОКSM в ИПСК. Дифференцировка – 40% дофаминергических нейронов Фибробласты репрограммированы ретровирусной доставкой ОКSM в ИПСК. Дифференцировка – 12% дофаминергических нейронов	1. Повышение уровня мРНК SNCA и белка α -синуклеина 2. Повышение секреции α -синуклеина	[94]
<i>PARK2</i>	Делеция экзонов: 2-4; Делеция экзонов 6 и 7	Фибробласты от 2 пациентов репрограммированы ретровирусной доставкой ОКSM в ИПСК. Дифференцировка в нейроны (общий пул)	1. Накопление α -синуклеина 2. Повышение экспрессии генов окислительного стресса 3. Повышение подверженности клеточной смерти под воздействием перекиси водорода	[95]
		Фибробласты от 2 пациентов репрограммированы ретровирусной доставкой ОКSM и NANOG в ИПСК. Дифференцировка в дофаминергические нейроны	1. Нарушение регуляция в синапсах (спонтанный выброс дофамина, сниженный обратный захват) 2. Повышенная продукция активных форм кислорода 3. Усиленная экспрессия MAO и других генов окислительного стресса	[117]
	Делеция экзонов: 3 и 5; Делеция экзона 3	Фибробласты от 2 пациентов репрограммированы ретровирусной доставкой ОКSM и NANOG в ИПСК. Дифференцировка в дофаминергические нейроны	1. Накопление α -синуклеина 2. Нарушение морфологии митохондрий 3. Замедленная митофагия. 4. Усиленная экспрессия MAO и других генов окислительного стресса	[57]

Окончание таблицы 1

Ген	Мутация	Клеточная модель	Результаты	Ссылки
<i>PARK2</i> и <i>PARK6</i> (<i>PINK1</i>)	<i>PINK1</i> (Q456X) и <i>PARK2</i> (V324a)	Фибробласты репрограммированы с помощью вируса Сендай, экспрессирующего OKSM. Дифференцировка в дофаминергические нейроны	1. Снижение длины дендритов (подобные морфологические изменения при мутации в <i>LRRK2</i>) 2. Снижение выживаемости нейронов в культуре	[138]
<i>GBA</i>	N370S/ 84GG	Из фибробластов пациента с болезнью Гоше были получены ИПСК с помощью ретровирусной доставки OKSM. При дифференцировке выход около 10% дофаминергических нейронов	1. Образование растворимых олигомеров α -синуклеина коррелирует со снижением лизосомального протеолиза 2. Увеличение включений α -синуклеина коррелирует с нарушением работы лизосомальной системы аутофагии 3. Специфическое нарушение работы системы лизосомальной деградации α -синуклеина	[139]

Таблица 2. Типы наследования мутаций ряда генов при болезни Паркинсона

Ген	Белок	Тип наследования
<i>PARK8 (LRRK2)</i>	Обогащённая лейциновыми повторами киназа 2	Аутосомно-доминантный
<i>PARK1 (SNCA)</i>	α -синуклеин	Аутосомно-доминантный
<i>PARK2 (Parkin)</i>	Паркин	Аутосомно-рецессивный
<i>PARK6 (PINK1)</i>	PTEN-индуцированная киназа 1	Аутосомно-рецессивный
<i>GBA</i>	Глюкоцереброзидаза	Аутосомно-рецессивный

PARK8 (LRRK2)

Ген *PARK8 (LRRK2)* кодирует белок, являющийся членом семейства киназ, обогащённых лейциновыми повторами. Этот белок обладает ГТФазной и киназной активностями. Замены внутри этого гена наиболее изучены не только потому, что встречаются наиболее часто, но и потому, что клиническая картина при таких мутациях схожа с таковой при спорадических случаях возникновения БП [65].

При этом *PARK8 (LRRK2)* является потенциальной новой мишенью для терапии БП [66]. Среди известных мутаций в этом гене можно выделить:

1) в домене киназы, усиливающие киназную активность (G2019S, I2020T);

2) в домене ГТФазы, снижающие ГТФазную активность (R1441G/C/H);

3) в домене, связывающем два вышеописанных (Y1699C) [66].

Предыдущие исследования на клетках [67, 68], мухах [69], червях [70], трансгенных животных [71] показали, что гиперэкспрессия *LRRK2*^{G2019S} может индуцировать или усиливать фенотип БП (нейротоксичность, нарушение секреции дофамина, изменение морфологии отростков нейронов). Обнаружение патогенных мутаций в гене *PARK 8 (LRRK2)* открыло возможность для терапии БП. Однако возникли сложности из-за отсутствия знаний о биологии *LRRK2* и адекватных доклинических моделей, чтобы разработать препараты для клинических испытаний,

появились ограничения, связанные с проницаемостью ГЭБ [66]. Наиболее перспективные ингибиторы GNE-0877 и GNE-9605 обладают достаточно высокой проницаемостью через ГЭБ. Эти соединения продемонстрировали надёжное, дозозависимое ингибирование *PARK8 (LRRK2)* в головном мозге трансгенных мышей, экспрессирующих человеческий белок *LRRK2*^{G2019S} [72], и, что немаловажно, эффект наблюдается и при пероральном приёме [73]. Другой новейший ингибитор MLi-2 в дозе 10 мг/кг перорально демонстрирует максимальное снижение активности *PARK8 (LRRK2)* (до 90%) у мышей дикого типа через 1 ч. после приёма [74].

Другой проблемой для клинических испытаний является ожидаемое большое количество побочных эффектов со стороны таких органов как почки, лёгкие, периферическая иммунная система, т.к. они демонстрируют намного большую экспрессию *PARK8 (LRRK2)*, чем клетки мозга. Было высказано предположение, что *PARK8 (LRRK2)* играет важную роль в иммунном ответе. Связь *PARK8 (LRRK2)* с иммунной системой подчеркивается высокой экспрессией этого гена в моноцитах, макрофагах и первичных микроглиях [75], генетической предрасположенностью носителей мутации к воспалительным заболеваниям кишечника [76] и лепре [77], более того, сама экспрессия *PARK 8 (LRRK2)* стимулируется такими специфическими иммунными сигналами, как IFN и агонистами TLR [78-80].

Была предложена гипотеза, в которой причина идиопатической БП и некоторых случаев наследственной БП, связаны с дисрегуляцией воспалительной реакции. В качестве клеточной модели были использованы первичные дермальные фибробласты пациентов с БП. В контрольную группу входили 6 условно здоровых доноров, в группу LRRK2^{G2019S} — 4 пациента, LRRK2^{R1441G} — 5 и в группу с идиопатической БП — 3 пациента. В мутантных клетках LRRK2^{R1441G} и клетках от пациентов с идиопатической формой БП были обнаружены высокие уровни мРНК ЦОГ-2 (циклооксигеназы-2) и сходный с контролем уровень конечного белка. Попытки выключить ген *PARK8 (LRRK2)* привели к снижению уровня мРНК, однако не повлияли на уровень белка. Расхождение между уровнем РНК ЦОГ-2 и белка ЦОГ-2 привело авторов к мысли, что *PARK8 (LRRK2)* может участвовать в стабилизации мРНК ЦОГ-2 [46]. Было показано, что белок HuR (антиген R человека) стабилизирует мРНК основных компонентов клеточной пролиферации и роста [81], среди которых есть и мРНК ЦОГ-2 [82]. HuR — ядерный белок, который после активации мигрирует в цитоплазму, где и стабилизирует мРНК [81]. Его функция зависит от сигнальных путей MAPK, p38 и ERK [82]. Исследования показали, что при идиопатической БП и при мутации в гене *PARK8 (LRRK2)* R1441G белок HuR преобладает в цитоплазме в отличие от группы контроля [46]. Таким образом, он может стабилизировать мРНК ЦОГ-2 в отсутствие каких-либо сигналов воспаления. Кроме того, в этих клетках были обнаружены высокие уровни p38a [46]. Посмертно в *substantia nigra* пациентов с БП также были обнаружены высокие уровни ЦОГ-2 в сравнении с контролем [46]. Более того нейроны, несущие G2019S и R1441G мутации в *PARK8 (LRRK2)* показали нарушение сигнализации NF-κB и изменение генов-мишеней для транскрипции NF-κB под воздействием нокдауна гена *PARK8 (LRRK2)* [83]. В результате анализа полученных данных, авторы предлагают другой путь для терапии: не только ингибиторы *PARK8 (LRRK2)*, но и нестероидные противовоспалительные средства, ингибирующие ЦОГ-2 [46]. Однако вопрос касательно точных механизмов и роли LRRK2 в воспалительном ответе до конца не изучен и требует дальнейших исследований.

Если же подходящий ингибитор будет найден, возникает вопрос на этапе клинических испытаний. Нужно ли лечить носителей мутации для того, чтобы предотвратить развитие заболевания или только уже имеющих патологию с целью остановить её прогрессирование? Пенетрантность мутации G2019S оценивается как 20–50% [84, 85]. Соответственно, маловероятно, что такое лекарственное средство станут применять для носителей мутации. Проблема переноса этих достижений в клинику основана на отсутствии идеальных доклинических моделей, которые бы доказывали эффективность и безопасность данных препаратов для испытаний на людях. Наиболее многообещающим выглядит моделирование БП на нейронах, дифференцированных из ИПСК с применением высокоселективных ингибиторов *PARK8 (LRRK2)*.

На настоящий момент, с помощью ИПСК удалось получить некоторые сведения относительно нарушений, связанных с мутациями в гене *PARK8 (LRRK2)*. Дисфункцию *PARK8 (LRRK2)* ассоциируют с уменьшением количества отростков нейронов и на-

рушенными механизмами аутофагии [86, 87]. Была обнаружена связь между геном *PARK8 (LRRK2)* и уровнем α-синуклеина. Накопление α-синуклеина может происходить в результате повышенной транскрипции или трансляции или сниженной деградации. В работе были использованы пациент-специфичные нейроны, дифференцированные из ИПСК, несущих мутации в гене *PARK8 (LRRK2)*. Данные, полученные в результате проведенных исследований, противоречивы: т.к. в одной группе было показано повышение транскрипции гена *PARK1 (SNCA)* [59], а в других группах этот результат не подтвердился [58, 59, 61].

Существует иная гипотеза о том, что мутантный LRRK2 влияет на уровень α-синуклеина, нарушая шаперон-опосредованную аутофагию (ШОА) — механизм деградации α-синуклеина [60]. Было обнаружено, что α-синуклеин находится там же, где и лизосомальные маркёры. Это позволило предположить, что α-синуклеин накапливается в лизосомах, когда снижена его деградация. Однако прицельное ингибирование ШОА в *PARK8 (LRRK2)*-мутантных клетках имеет более выраженное влияние на уровень α-синуклеина, чем в контрольных (клеткам 3 нед.). То есть в мутантных клетках по гену *PARK8 (LRRK2)* ШОА более активна, а уровень α-синуклеина высок. Авторы считают, что, исходя из этого, механизм не может быть приписан дефекту ШОА. Однако, не стоит исключать вариант, что мутации гена *PARK8 (LRRK2)* хоть и не приводят к ингибированию ШОА, но при этом существенно снижают эффективность его работы. Изучая влияние мутации G2019S в гене *PARK8 (LRRK2)* на компоненты ШОА было продемонстрировано, что она приводит к ингибированию белка LAMP2A [60]. LAMP2A — лизосом-ассоциированный мембранный белок, который имеет три формы в зависимости от альтернативного сплайсинга, формы 2A, 2B и 2C. Форма 2A представляет собой рецептор к ШОА. Авторы приходят к выводу, что накопление α-синуклеина связано с скомпрометированным механизмом ШОА.

Показано, что замены аминокислот в LRRK2 влияют на морфологию клеток, приводя к уменьшению числа и длины дендритов, изменениям морфологии ядерной мембраны, однако, каковы механизмы такого влияния неизвестно [58, 60, 61]. Предполагают, что они могут быть связаны с комбинацией сверхактивации ERK-сигнального пути, изменением экспрессии генов и дефектами аутофагии [88]. В одном исследовании были обнаружены изменения ядра клетки: нарушение его архитектуры и частичная потеря ламинина B1 и B2 [55].

PARK1 (SNCA)

Ген *PARK1 (SNCA)* кодирует нейрональный пре-синаптический белок α-синуклеин, концентрация которого более всего высока в нервных окончаниях [89]. Агрегации α-синуклеина были найдены в тельцах Леви [8]. Его накопление связывают с причиной ряда болезней, синуклеинопатий, в которые входит не только БП, но и деменция с тельцами Леви, мультисистемная атрофия и др. [90–92].

Мутации этого гена ассоциированы с тяжёлой, рано дебютирующей формой БП [93]. Среди них как миссенс-мутации (такие как A53T, E46K, A30P), так и увеличение копийности гена (дубликации и трипликации). Наиболее интересной здесь является

трипликация. Однако, данные снова противоречивы. В одном исследовании было показано, что накоплению белка α -синуклеина соответствует большее количество мРНК *PARK1 (SNCA)* в полученных из ИПСК нейронах, несущих маркеры тирозингидроксилазы [94], а в другом исследовании не было найдено существенных различий в экспрессии *PARK1 (SNCA)* между полученными из ИПСК нейронами (без определения каких-либо маркеров) и контролем [95]. Также в исследовании В. Вуэрс и соавт. (2011) было показано, что трипликация *PARK1 (SNCA)* приводит к окислительному стрессу и повышению уровня экспрессии моноаминоксидазы-А [95]. Однако сама трипликация целого гена влияет на большой локус в геноме, и нельзя сказать, что ответственность за такой фенотип несёт только ген *PARK1 (SNCA)*.

При исследовании фенотипа мутации A53T С. Chung и соавт. (2013) показали, что в нейронах были повышены такие показатели, как уровень NO и нитрования белков [96]. Предполагают, что в данном случае повышенный уровень NO приводит к нитрозирующему стрессу. Фактор транскрипции MEFC2 в этом случае поддается инактивирующему влиянию свободных радикалов, при этом являясь основным механизмом S-нитрозилирования Cys39 остатка α -синуклеина [97]. Этот фенотип был частично исправлен добавлением L-NAME, ингибитора NO-синтазы. Удивительно, но применение изоксазола для активации MEFC2 почти полностью нивелировало влияние различных митохондриальных токсинов, таких как ротенон.

В недавней работе августа 2016 г. с помощью технологии FRET были получены данные по α -синуклеину, частично подтверждающие результаты вышеупомянутой работы 2010 г. на мышах [43]. Было обнаружено, что α -синуклеин также располагается на поверхности везикулы и к тому же плотность его распространения очень близка к плотности синаптобrevина на поверхности той же везикулы [98]. Исходя из этого, авторы сделали предположение, что α -синуклеин является частью всего комплекса, что согласуется с теми выводами, к которым иными путями пришёл J. Burre (2010) [43]. Более того, α -синуклеин вовлечен в индукцию формирования структуры везикулы, приводя к сворачиванию билипидного слоя [99–101]. Так, α -синуклеин участвует в индукции образования везикулы и связывается с синаптобrevином. α -синуклеин имеет в своей структуре нерегулярную часть. Возможно, считают авторы, существует некий третий фактор, который стабилизирует нерегулярную часть α -синуклеина, приводя при этом к дестабилизации мембраны везикулы и запуская процесс взаимодействия SNARE-комплекса с последующим высвобождением содержимого везикулы за пределы клетки [98].

Предполагают, что α -синуклеин меняет свою конформацию в зависимости от окружения и способен выполнять различные функции, одна из которых в пресинаптической терминали связана с взаимодействием со SNARE комплексом, а другая — с регуляцией синтеза дофамина. Возможно, он может участвовать в транспорте дофамина к пресинаптической щели [102].

Отвлечением в изучении гиперэкспрессии α -синуклеина являются работы, направленные на поиск влияния микрофлоры кишечника на состояние нервной системы. Существуют данные, свидетельствующие о двунаправленности процессов

между ЦНС и кишечником в тревожных состояниях, депрессии и расстройствах аутистического спектра [103–105]. Полагают, что медиаторы, иммунная сигнализация, гормоны и нейропептиды, секретируемые в кишечнике, могут оказывать влияние на ЦНС [106, 107]. Трансгенные животные с гиперэкспрессией α -синуклеина в отсутствие микрофлоры или под воздействием антибиотиков демонстрируют снижение активации микроглии, двигательные нарушения, обнаруживаются включения α -синуклеина в дофаминергических нейронах по сравнению с теми же трансгенными животными с нормальной (сложной) микрофлорой кишечника [108]. При этом восстановление микрофлоры приводит к снижению проявления вышеописанных симптомов. Это позволило предположить, что взаимодействие сверхэкспрессии α -синуклеина и нарушения микрофлоры кишечника влияет на исход заболевания. Увеличение состояния активации микроглии и производство провоспалительных цитокинов приводят к гибели нейронов в моделях БП и других нейродегенеративных заболеваний [109, 110]. Провоспалительные факторы, выделяемые микробиотой, могут проникать через ГЭБ и повышать реактивность микроглии. Интересно, что воспалительное микроокружение увеличивает агрегацию α -синуклеина, что может дополнительно активировать ранее интактные микроглии и, таким образом, замыкать порочный круг прогрессирования заболевания [111]. Таким образом, авторы предполагают, что активация микроглии, являющейся маркером нейродегенеративного процесса, происходит при нарушении сложной микрофлоры кишечника и выделении ею провоспалительных факторов. В то время как под воздействием антибиотиков сохраняется фенотип заболевания, связанный с накоплением α -синуклеина, а при наличии условно нормальной микрофлоры кишечника фенотип заболевания несколько исправляется. Гипотеза такова: нарушение микрофлоры кишечника является важным сопутствующим фактором при БП, усиливающим фенотип заболевания.

PARK2 (Parkin) и PARK6 (PINK1)

Ген *PARK2 (Parkin)* кодирует белок паркин. Этот ген экспрессируется в различных тканях, но более всего в черной субстанции головного мозга. Считается, что он участвует в процессе убиквитин-зависимой деградации белка [112]. Для присоединения молекул убиквитина к белку должна пройти каскадная реакция с E1 — убиквитинактивирующим ферментом, затем с E2 — убиквитинконъюгирующим ферментом и с E3 — убиквитинлигирующим ферментом. Полагают, что паркин обладает убиквитинлигирующими свойствами [112]. В то же время ген *PARK6 (PINK1)* кодирует митохондриальную PTEN-индуцированную киназу 1, которая тем или иным образом осуществляет защиту митохондрий от стрессорных агентов [113]. Предполагается, что эти два гена действуют в одной системе, где паркин отслеживает целостность митохондрии и, в случае её повреждения, запускает через *PARK6 (PINK1)* механизмы аутофагии (в литературе используется термин митофагия — аутофагия митохондрий). Есть теория, что в механизмах митофагии *PARK6 (PINK1)* играет роль, перекрывающую *PARK2 (Parkin)*. В 2013 г. команда А. Ракович показала, что при мутации *PARK6 (PINK1)* обнаруживается дефицит паркина [114]. Такие

клетки характеризуются сниженным мембранным потенциалом митохондрий и сниженной активностью митохондриального комплекса I. Интересно то, что лентивирусная экспрессия продукта *PARK6* (*PINK1*) в таких дофаминергических нейронах привела к восстановлению уровня паркина в митохондриях [115].

Мутации этих генов ассоциированы с ранним дебютом БП и аутосомно рецессивным типом наследования [116].

В то время как одна группа исследователей показала повышенный уровень активных форм кислорода в нейронах с мутацией *Parkin*, производя измерения по индикатору 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеину (ДХФ) [57], другая группа не отметила никаких признаков повышенного базального окислительного стресса, которые они измеряли косвенно, через наличие карбонил-белков (маркёров окислительного стресса) в нейронах [117]. Мутантный паркин также связан с дестабилизацией микротрубочек, что приводит к укорочению отростков и снижению выживаемости клетки [118].

Достоверно стало известно только то, что эти клетки стали более уязвимы к окислительному стрессу. Кроме митофагии и участия в протеасомной деградации белков, паркин также ассоциируется с гомеостазом дофамина. Обнаружено, что нейроны с дисфункцией паркина обладают повышенным спонтанным высвобождением дофамина и сниженным поглощением его, что предполагает наличие больших концентраций внеклеточного дофамина *in vivo* [117].

Подобная картина наблюдается и при мутациях гена *PARK6* (*PINK1*). Интересно, что повышенная чувствительность нейронов устраняется после обработки клеток ингибитором *PARK8* (*LRKK2*), что позволяет предположить, что он как-то участвует в гибели клеток в результате мутаций *PARK6* (*PINK1*) [56].

GBA1

Этот ген кодирует лизосомальный мембранный белок бета-глюкоцереброзидазу (иначе, бета-глюкозидазную кислоту, ГЦаза). Мутации этого гена до определенного момента связывали только с болезнью Гоше. При этой патологии недостаточность лизосомального фермента глюкоцереброзидазы приводит к накоплению глюкоцереброзида во многих тканях [119]. Но появились работы, связывающие мутации в гене *GBA1* и БП, поскольку выяснилось, что они также приводят к накоплению α -синуклеина и встречаются у пациентов, имеющих диагноз болезни Паркинсона [120, 121]. Сниженная активность глюкоцереброзидазы была обнаружена как у пациентов с наследственной формой болезни Паркинсона, так и со спорадической.

Обнаружен двунаправленный эффект между накоплением α -синуклеина и дефицитом активности ГЦазы. Накопление белка увеличивает дефицит активности фермента, сниженная активность фермента приводит к накоплению белка [122].

Существуют также другие генетические мутации, в генах *PARK17* (*VPS35*), *PARK7* (*DJ-1*), *PARK14* (*PLA2G6*), *PARK5* (*UCHL1*) и *MAPT*, роль которых требует разъяснения в дальнейших исследованиях [123, 124]. Также был обнаружен новый ген, имеющий ассоциацию с БП, кодирующий трансмембран-

ный белок 230 (*TMEM230*) [125]. В первичных нейронах мышцы патологические варианты *TMEM230* влияли на движение синаптических пузырьков, что позволяет предположить, что *TMEM230* замедляет везикулярный транспорт. Далее авторы получили линию НЕК293 с патогенным вариантом *TMEM230* и обнаружили увеличение уровня α -синуклеина [125].

Некодирующие РНК и болезнь Паркинсона

В геноме человека — около 1,5–2% белок-кодирующих последовательностей, а оставшаяся часть, подвергающаяся транскрипции, но не кодирующая белки, представляет собой некодирующие РНК [126]. Полагают, что они обладают важной регуляторной активностью в развитии клетки, выполнении её функций, а также играют роль в патогенезе заболеваний [127, 128]. Среди некодирующих РНК наиболее изучены микроРНК.

Ключевую роль в процессинге малых интерферирующих РНК (siRNA) и микроРНК (miRNA) играет рибонуклеаза Dicer [129]. В исследовании на эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) делеция в *Dicer* приводила к потере популяции дофаминергических нейронов при дифференцировке. Более того, фенотип дофаминергических нейронов был восстановлен трансфекцией miRNA [130]. Эта работа показала, что некоторые гены, связанные с БП, могут быть подвержены влиянию miRNA. Например, экспрессия α -синуклеина модулируется miR-153 и miR-7, которые напрямую связываются с 3'UTR областью гена α -синуклеина [131, 132]. В одной из работ были найдены шесть микроРНК, которые могут участвовать в патогенезе БП. У нелеченных пациентов в сравнении с контролем были снижены уровни miR-1, miR-22, miR-29a, в то время как у пациентов, проходивших лечение были повышены уровни miR-16-2, miR-26a-2, miR-30a в сравнении с пациентами, не получавшими лечения. Все эти микроРНК могут быть связаны с действием α -синуклеина, а miR-1 и miR-30a вероятно играют роль в транспортировке дофамина [133]. После начала проявления симптомов проводили исследование микроРНК плазмы крови пациентов с БП (31 человек) и контрольных здоровых людей (25 человек). Была выявлена значительно возросшая экспрессия только одной miR-331-5p [134]. В другом исследовании нашли 16 микроРНК, экспрессия которых была выше у пациентов с БП, чем у здоровых людей. Из них три, miR-16, miR-20a и miR-320 — были обнаружены в лейкоцитах крови [135]. Подобные исследования крайне актуальны, поскольку, как уже было описано, диагностических критериев для обнаружения БП на ранних стадиях крайне мало, и на данный момент не существует конкретных биомаркеров заболевания. Специфической микроРНК для дофаминергических нейронов считают miR-133b, формирующую отрицательную обратную связь с фактором транскрипции PITX3, в дофаминергических нейронах среднего мозга. Подавление этой микроРНК играет важную нейропротективную роль [130]. Ингибирование miR-205 в мышиной модели БП привело к увеличению экспрессии гена *PARK8* (*LRKK2*) [136].

Таким образом, многочисленные исследования, посвященные изучению микро РНК, доказывают важную роль нарушений их регуляции в патогенезе БП [137].

Заключение

В изучении БП есть два основных направления для исследований: решение вопросов клинического характера и фундаментального. Фундаментальным является понимание сути происходящих процессов, взаимодействия генов и их функции в норме. На настоящий момент для большей части генов, ассоциированных с БП, неизвестны взаимодействия между ними (рис. 5).

Наибольшее развитие в изучении получили «основные» гены, ассоциированные с БП, *PARK1 (SNCA)* и *PARK8 (LRRK2)*.

Важной задачей исследований остаётся поиск лекарственных препаратов для терапии БП и улучшения качества жизни пациентов. Для этого необходима совместная работа различных специалистов по поиску терапевтических мишеней, разработке лекарственных препаратов и их тестированию. На настоящий момент, на этап первой стадии клинических испытаний вырвался разработанный вектор AAV2-hAADC, содержащий кДНК ДАА человека, позволяющий предотвратить ограничение фермента, необходимого для конвертации леводопы в дофамин. Проходят доклинические испытания ингибиторы *PARK8 (LRRK2)*, GNE-0877, GNE-9605 и MLi2. Разрабатываются новые лекарственные средства, ведётся поиск соединений, смягчающих патологический фенотип (п-бутилиден-фтилад, NAB2). Предлагается протестировать НПВС в но-

вом ключе для терапии БП, исходя из новых данных о связи *LRRK2* и механизмов воспаления. Активно идёт поиск новых мишеней для терапии, новых генов, вовлечённых в патологическое состояние, мутаций, приводящих к патологическому фенотипу. Осуществляется поиск причин для возникновения спорадических форм БП. В контексте же определенных мутаций, с развитием технологий редактирования генома, можно ожидать, что далее они будут лишь совершенствоваться, и откроют перспективы для безопасного редактирования генома человека *in vivo*.

Список обнаруженных микроРНК, вовлеченных в патогенез БП постоянно растёт, и крайне актуально не только искать всё новые и новые взаимосвязи, сколько структурировать и систематизировать взаимоотношения между белок-кодирующей и некодирующей частью генома. Это позволит не только устанавливать связи между некоторым фенотипом и конкретными микроРНК или геном, но и найти мишени для терапии и исправления патологии. МикроРНК крайне перспективны для обнаружения маркера ранней стадии БП.

Благодарности

Финансирование работы осуществлялось в рамках бюджетного проекта ФГБНУ Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СО РАН №0324-2016-0003.

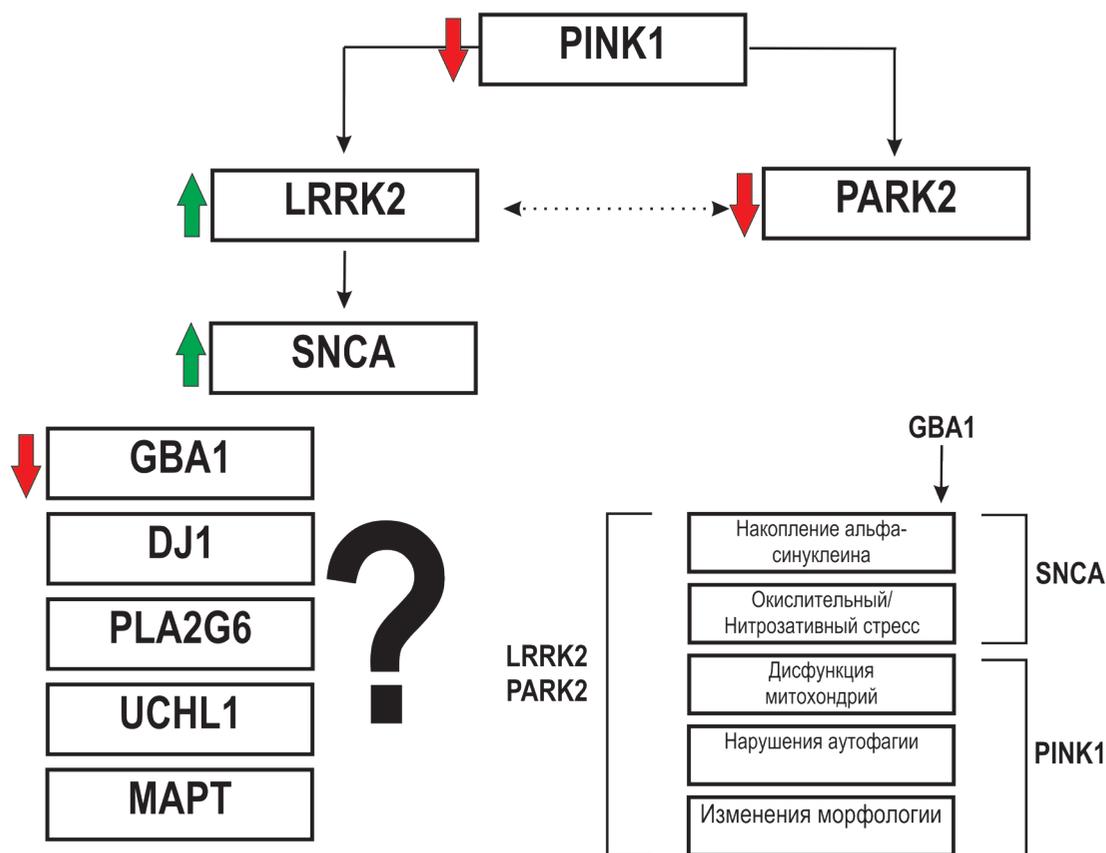


Рис. 5. Схема иерархии регуляции экспрессии генов, основные патологические фенотипические черты при мутациях генов *GBA1*, *PARK1 (SNCA)*, *PARK6 (PINK1)*, *PARK8 (LRRK2)*, *PARK2 (Parkin)*. Приведены некоторые гены, ассоциированные с болезнью Паркинсона, данных о роли которых крайне недостаточно

ЛИТЕРАТУРА:

1. Thomas B., Beal M.F. Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 2007; 16(R2): R183-94.
2. Suppa A., Bologna M., Conte A. et al. The effect of L-dopa in Parkinson's disease as revealed by neurophysiological studies of motor and sensory functions. *Expert Rev. Neurother.* 2017; 17(2): 181-92.
3. Lees A.J. Unresolved issues relating to the Shaking Palsy on the celebration of James Parkinson's 250th birthday. *Mov. Disord.* 2007; 22(S17): S327-34.
4. Goedert M., Spillantini M.G., Del Tredici K. et al. 100 years of Lewy pathology. *Nat. Rev. Neurol.* 2012; 9(1): 13-24.
5. Ikeda K., Ikeda S., Yoshimura T. et al. Idiopathic Parkinsonism with Lewy-type inclusions in cerebral cortex. A case report. *Acta Neuropathol.* 1978; 41(2): 165-8.
6. Wakabayashi K., Toyoshima Y., Awamori K. et al. Restricted occurrence of Lewy bodies in the dorsal vagal nucleus in a patient with late-onset parkinsonism. *J. Neurol. Sci.* 1999; 165(2): 188-91.
7. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276(5321): 2045-7.
8. Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M. et al. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388(6645): 839-40.
9. Spillantini M.G., Crowther R.A., Jakes R. et al. Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci. Lett.* 1998; 251(3): 205-8.
10. Wakabayashi K., Yoshimoto M., Tsuji S. et al. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci. Lett.* 1998; 249(2-3): 180-2.
11. Gelb D.J., Oliver E., Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 1999; 56(1): 33-9.
12. Poewe W., Antonini A., Zijlmans J.C. et al. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. *Clin. Interv. Aging* 2010; 5: 229-38.
13. Шток В.Н., Федорова Н.В. Болезнь Паркинсона. В: Шток В.Н., Иванова-Смоленская И.А., Левин О.С., редакторы. Экстрапирамидные расстройства. Руководство по диагностике и лечению. Москва: МЕДпресс-информ; 2002. с. 87-124.
14. Contin M., Riva R., Albani F. et al. Pharmacokinetic optimisation in the treatment of Parkinson's disease. *Clin. Pharmacokinet.* 1996; 30(6): 463-81.
15. Ciesielska A., Sharma N., Beyer J. et al. Carbidopa-based modulation of the functional effect of the AAV2-hAADC gene therapy in 6-OHDA lesioned rats. *PLoS One* 2015; 10(4): 1-14.
16. Forsayeth J.R., Eberling J.L., Sanftner L.M. et al. A Dose-ranging study of AAV-hAADC therapy in parkinsonian monkeys. *Mol. Ther.* 2009; 14(4): 571-7.
17. Christine C.W., Starr P.A., Larson P.S. et al. Safety and tolerability of putaminal AADC gene therapy for Parkinson disease. *Neurology* 2009; 73(20): 1862-9.
18. Mittermeyer G., Christine C.W., Rosenbluth K.H. et al. Long-term evaluation of a phase 1 study of AADC gene therapy for Parkinson's disease. *Hum. Gene Ther.* 2012; 23(4): 377-81.
19. Князькина Ю.А. Оценка эффективности терапии пирибедилом пациентов с болезнью Паркинсона при моторных флуктуациях и лекарственных дискинезиях. В: Иллариошкин С.Н., Левин О.С., редакторы. Болезнь Паркинсона и расстройство движений. Москва: ЗАО «РКИ Соверо пресс»; 2014. с. 195-7.
20. Goetz C.G., Poewe W., Rascol O. et al. Evidence-based medical review update: Pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001 to 2004. *Mov. Disord.* 2005; 20(5): 523-39.
21. Федорова Н.В., Шток В.Н. Стратегия и тактика лечения болезни Паркинсона. *Cons. Medicum* 2001; 5: 237-40.
22. Яхно Н.Н., Нодель М. Современные принципы терапии болезни Паркинсона. *РМЖ* 2010; 10: 418.
23. Rodriguez R.L., Fernandez H.H., Haq I. et al. Pearls in Patient Selection for Deep Brain Stimulation. *Neurologist* 2007; 13(5): 253-60.
24. Shih L.C., Tarsy D. Deep brain stimulation for the treatment of atypical parkinsonism. *Mov. Disord.* 2007; 22(15): 2149-55.
25. Li Z., Lin Q., Huang W. et al. Target gene capture sequencing in Chinese population of sporadic Parkinson disease. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(20): e836.
26. Nuytemans K., Bademci G., Inchausti V. et al. Whole exome sequencing of rare variants in EIF4G1 and VPS35 in Parkinson disease. *Neurology* 2013; 80(11): 982-9.
27. Dansithong W., Paul S., Scoles D.R. et al. Generation of SNCA Cell Models Using Zinc Finger Nuclease (ZFN) Technology for Efficient High-Throughput Drug Screening. *PLoS One* 2015; 10(8): e0136930.
28. Soldner F., Laganière J., Cheng A.W. et al. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell* 2011; 146(2): 318-31.
29. Dow L.E., Fisher J., O'Rourke K.P. et al. Inducible in vivo genome editing with CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 2015; 33(4): 390-4.
30. Zhou X., Xin J., Fan N. et al. Generation of CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015; 72(6): 1175-84.
31. Wang X., Cao C., Huang J. et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 2016; 9(6): 1-7.
32. Soldner F., Stelzer Y., Shivalila C.S. et al. Parkinson-associated risk variant in distal enhancer of α -synuclein modulates target gene expression. *Nature* 2016; 533(7601): 95-9.
33. Nalls M.A., Pankratz N., Lill C.M. et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 2014; 46(9): 989-93.
34. Abeliovich A., Rhinn H. Parkinson's disease: Guilt by genetic association. *Nature* 2016; 533(7601): 40-1.
35. Devine M.J., Gwinn K., Singleton A. et al. Parkinson's disease and α -synuclein expression. *Mov. Disord.* 2011; 26(12): 2160-8.
36. Liu Z., Wang X., Yu Y. et al. A Drosophila model for LRRK2-linked parkinsonism. *PNAS USA* 2008; 105(7): 2693-8.
37. Feany M.B., Bender W.W. A Drosophila model of Parkinson's disease. *Nature* 2000; 404(6776): 394-8.
38. McGurk L., Berson A., Bonini N.M. Drosophila as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease. *Genetics* 2015; 201(2): 377-402.
39. Yao C., El Khoury R., Wang W. et al. LRRK2-mediated neurodegeneration and dysfunction of dopaminergic neurons in a Caenorhabditis elegans model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 2010; 40(1): 73-81.
40. Fu R.H., Harn H.J., Liu S.P. et al. n-butylideneephthalide protects against dopaminergic neuron degeneration and α -synuclein accumulation in Caenorhabditis elegans models of Parkinson's disease. *PLoS One* 2014; 9(1): e85305.
41. Vera E., Studer L. When rejuvenation is a problem: challenges of modeling late-onset neurodegenerative disease. *Development* 2015; 142(18): 3085-9.
42. Bombardier J.P., Munson M. Three steps forward, two steps back: Mechanistic insights into the assembly and disassembly of the SNARE complex. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015; 29: 66-71.
43. Burré J., Sharma M., Tsetsenis T. et al. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 2010; 329(5999): 1663-7.
44. Bungeroth M., Appenzeller S., Regulin A. et al. Differential aggregation properties of alpha-synuclein isoforms. *Neurobiol. Aging* 2014; 35(8): 1913-9.
45. Eckermann K., Kügler S., Bähr M. Dimerization propensities of Synucleins are not predictive for Synuclein aggregation. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* 2015; 1852(8): 1658-64.
46. Lopez de Maturana R., Aguila J.C., Sousa A. et al. Leucine-rich repeat kinase 2 modulates cyclooxygenase 2 and the inflammatory response in idiopathic and genetic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 2014; 35(5): 1116-24.
47. Lippolis R., Siciliano R.A., Pacelli C. et al. Altered protein expression pattern in skin fibroblasts from parkin-mutant early-onset Parkinson's disease patients. *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* 2015; 1852(9): 1960-70.
48. Amano T., Papanikolaou T., Sung L.Y. et al. Nuclear Transfer Embryonic Stem Cells Provide an In Vitro Culture Model for Parkinson's Disease. *Cloning Stem Cells* 2009; 11(1): 77-88.
49. Friling S., Andersson E., Thompson L.H. et al. Efficient production of mesencephalic dopamine neurons by Lmx1a expression in embryonic stem cells. *PNAS USA* 2009; 106(18): 7613-8.
50. Tian L.P., Zhang S., Zhang Y.J. et al. Lmx1b can promote the differentiation of embryonic stem cells to dopaminergic neurons associated with Parkinson's disease. *Biotechnol. Lett.* 2012; 34(7): 1167-74.
51. Kim D.W., Chung S., Hwang M. et al. Stromal Cell-Derived Inducing Activity, Nurr1, and Signaling Molecules Synergistically Induce Dopaminergic Neurons from Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 2006; 24(3): 557-67.
52. Chung S., Hedlund E., Hwang M. et al. The homeodomain transcription factor Pitx3 facilitates differentiation of mouse embryonic stem cells into AHD2-expressing dopaminergic neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* 2005; 28(2): 241-52.
53. Park I.H., Arora N., Huo H. et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; 134(5): 877-86.
54. Sanders L.H., Laganière J., Cooper O. et al. LRRK2 mutations cause mitochondrial DNA damage in iPSC-derived neural cells from Parkinson's disease patients: reversal by gene correction. *Neurobiol. Dis.* 2014; 62: 381-6.
55. Liu G.H., Qu J., Suzuki K. et al. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature* 2012; 491(7425): 603-7.
56. Cooper O., Seo H., Andrabi S. et al. Familial Parkinson's disease iPSCs show cellular deficits in mitochondrial responses that can be pharmacologically rescued. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4(141): 141ra90.
57. Imaizumi Y., Okada Y., Akamatsu W. et al. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and α -synuclein

- accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Mol. Brain* 2012; 5(1): 35.
58. Sánchez-Danés A., Richaud-Patin Y., Carballo-Carbajal I. et al. Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPSC-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol. Med.* 2012; 4(5): 380-95.
59. Nguyen H.N., Byers B., Cord B. et al. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 2011; 8(3): 267-80.
60. Orenstein S.J., Kuo S.H., Tasset I. et al. Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat. Neurosci.* 2013; 16(4): 394-406.
61. Reinhardt P., Schmid B., Burbulla L.F. et al. Genetic Correction of a LRRK2 Mutation in Human iPSCs Links Parkinsonian Neurodegeneration to ERK-Dependent Changes in Gene Expression. *Cell Stem Cell* 2013; 12(3): 354-67.
62. Некрасов Е.Д., Лебедева О.С., Честков И.В. и соавт. Получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека из фибробластов кожи пациентов с нейродегенеративными заболеваниями. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2011; 6(4): 82-8.
63. Ветчинова А.С., Коновалова Е.В., Волчков П.Ю. и соавт. Редактирование генома на клеточной модели генетической формы болезни Паркинсона. *Гены и Клетки* 2016; 11(2): 114-8.
64. Лебедева О.С., Лагарькова М.А., Киселев С.Л. и соавт. Морфофункциональные свойства индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных из фибробластов кожи человека и дифференцированных в дофаминергические нейроны. *Нейрохимия* 2013; 30(3): 233-41.
65. Haugarvoll K., Rademakers R., Kachergus J.M. et al. Lrrk2 R1441C parkinsonism is clinically similar to sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008; 70(Issue 16, Part 2): 1456-60.
66. Atashrazm F., Dzamko N. LRRK2 inhibitors and their potential in the treatment of Parkinson's disease: current perspectives. *Clin. Pharmacol.* 2016; 8: 177-189.
67. Greggio E., Jain S., Kingsbury A. et al. Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiol. Dis.* 2006; 23(2): 329-41.
68. Heo H.Y., Park J.M., Kim C.H. et al. LRRK2 enhances oxidative stress-induced neurotoxicity via its kinase activity. *Exp. Cell Res.* 2010; 316(4): 649-56.
69. Liu Z., Wang X., Yu Y. et al. A Drosophila model for LRRK2-linked parkinsonism. *PNAS USA* 2008; 105(7): 2693-8.
70. Yao C., El Khoury R., Wang W. et al. LRRK2-mediated neurodegeneration and dysfunction of dopaminergic neurons in a Caenorhabditis elegans model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 2010; 40(1): 73-81.
71. Ramonet D., Daher J.P., Lin B.M. et al. Dopaminergic Neuronal Loss, Reduced Neurite Complexity and Autophagic Abnormalities in Transgenic Mice Expressing G2019S Mutant LRRK2. *PLoS One* 2011; 6(4): e18568.
72. Estrada A.A., Chan B.K., Baker-Glenn C. et al. Discovery of Highly Potent, Selective, and Brain-Penetrant Aminopyrazole Leucine-Rich Repeat Kinase 2 (LRRK2) Small Molecule Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2014; 57(3): 921-36.
73. Fuji R.N., Flagella M., Baca M. et al. Effect of selective LRRK2 kinase inhibition on nonhuman primate lung. *Sci. Transl. Med.* 2015; 7(273): 273ra15.
74. Fell M.J., Mirescu C., Basu K. et al. MLI-2, a Potent, Selective, and Centrally Active Compound for Exploring the Therapeutic Potential and Safety of LRRK2 Kinase Inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2015; 355(3): 397-409.
75. Russo I., Bubacco L., Greggio E. LRRK2 and neuroinflammation: partners in crime in Parkinson's disease? *J. Neuroinflammation* 2014; 11(1): 52.
76. Umeno J., Asano K., Matsushita T. et al. Meta-analysis of published studies identified eight additional common susceptibility loci for Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011; 17(12): 2407-15.
77. Zhang F.R., Huang W., Chen S.M. et al. Genomewide association study of leprosy. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361(27): 2609-18.
78. Gardet A., Benita Y., Li C. et al. LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens. *J. Immunol.* 2010; 185(9): 5577-85.
79. Moehle M.S., Webber P.J., Tse T. et al. LRRK2 inhibition attenuates microglial inflammatory responses. *J. Neurosci.* 2012; 32(5): 1602-11.
80. Liu Z., Lee J., Krummey S. et al. The kinase LRRK2 is a regulator of the transcription factor NFAT that modulates the severity of inflammatory bowel disease. *Nat. Immunol.* 2011; 12(11): 1063-70.
81. Dai W., Zhang G., Makeyev E.V. RNA-binding protein HuR autoregulates its expression by promoting alternative polyadenylation site usage. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(2): 787-800.
82. Khabar K.S. Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; 67(17): 2937-55.
83. Lorez de Maturana R., Lang V., Zubiarrain A. et al. Mutations in LRRK2 impair NF- κ B pathway in iPSC-derived neurons. *J. Neuroinflammation* 2016; 13(1): 295.
84. Marder K., Wang Y., Alcalay R.N. et al. Age-specific penetrance of LRRK2 G2019S in the Michael J. Fox Ashkenazi Jewish LRRK2 Consortium. *Neurology* 2015; 85(1): 89-95.
85. Latourelle J.C., Sun M., Lew M.F. et al. The Gly2019Ser mutation in LRRK2 is not fully penetrant in familial Parkinson's disease: the GenePD study. *BMC Med.* 2008; 6: 32.
86. Dächsel J.C., Behrouz B., Yue M. et al. A comparative study of Lrrk2 function in primary neuronal cultures. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2010; 16(10): 650-5.
87. Tong Y., Gaiame E., Yamaguchi H. et al. Loss of leucine-rich repeat kinase 2 causes age-dependent bi-phasic alterations of the autophagy pathway. *Mol. Neurodegener.* 2012; 7(1): 2.
88. Jacobs B.M. Stemming the Hype: What can we learn from iPSC models of parkinson's disease and how can we learn it? *J. Parkinson's Dis.* 2014; 4(1): 15-27.
89. Lavedan C. The synuclein family. *Genome Res.* 1998; 8(9): 871-80.
90. Stefanova N., Wenning G.K. Review: Multiple system atrophy: emerging targets for interventional therapies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2016; 42(1): 20-32.
91. Sonnen J.A., Postupna N., Larson E.B. et al. Pathologic correlates of dementia in individuals with Lewy body disease. *Brain Pathol.* 2010; 20(3): 654-9.
92. Wang Q., Tian Q., Song X. et al. One-step generation of triple gene-targeted pigs using CRISPR/Cas9 system. *J. Clin. Lab. Anal.* 2016; 30(6): 1092-9.
93. Singleton A.B., Farrer M., Johnson J. et al. α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* 2003; 302(5646): 841.
94. Devine M.J., Rytten M., Vodicka P. et al. Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α -synuclein locus. *Nat. Commun.* 2011; 2: 440.
95. Byers B., Cord B., Nguyen H.N. et al. SNCA Triplication Parkinson's Patient's iPSC-derived DA Neurons Accumulate α -Synuclein and Are Susceptible to Oxidative Stress. *PLoS One* 2011; 6(11): e26159.
96. Chung C.Y., Khurana V., Auluck P.K. et al. Identification and Rescue of α -Synuclein Toxicity in Parkinson Patient-Derived Neurons. *Science* 2013; 342(6161): 983-7.
97. Ryan S.D., Dolatabadi N., Chan S.F. et al. Isogenic Human iPSC Parkinson's Model Shows Nitrosative Stress-Induced Dysfunction in MEF2-PGC1 α Transcription. *Cell* 2013; 155(6): 1351-64.
98. Fakhree M.A., Zijlstra N., Raiss C.C. et al. The number of α -synuclein proteins per vesicle gives insights into its physiological function. *Sci. Rep.* 2016; 6: 30658.
99. Braun A.R., Sevcsik E., Chin P. et al. α -Synuclein Induces Both Positive Mean Curvature and Negative Gaussian Curvature in Membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 2012; 134(5): 2613-20.
100. Braun A.R., Lacy M.M., Ducas V.C. et al. α -Synuclein-Induced Membrane Remodeling Is Driven by Binding Affinity, Partition Depth, and Interleaflet Order Asymmetry. *J. Am. Chem. Soc.* 2014; 136(28): 9962-72.
101. Varkey J., Isas J.M., Mizuno N. et al. Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(42): 32486-93.
102. Sidhu A., Wersinger C., Moussa C.E. et al. The role of α -synuclein in both neuroprotection and neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1035: 250-70.
103. Mayer E.A., Padua D., Tillisch K. Altered brain-gut axis in autism: Comorbidity or causative mechanisms? *BioEssays* 2014; 36(10): 933-9.
104. Sharon G., Sampson T.R., Geschwind D.H. et al. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell* 2016; 167(4): 915-32.
105. Schroeder B.O., Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* 2016; 22(10): 1079-89.
106. Selkirk J., Wong P., Zhang X. et al. Metabolic tinkering by the gut microbiome. *Gut Microbes* 2014; 5(3): 369-80.
107. Wall R., Cryan J.F., Ross R.P. et al. Bacterial Neuroactive Compounds Produced by Psychobiotics. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2014; 817: 221-39.
108. Sampson T.R., Debelius J.W., Thron T. et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell* 2016; 167(6): 1469-80.
109. Kannarkat G.T., Boss J.M., Tansey M.G. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. *J. Parkinson's Dis.* 2013; 3(4): 493-514.
110. Sanchez-Guajardo V., Barnum C.J., Tansey M.G. et al. Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to α -synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity. *ASN Neuro* 2013; 5(2): 113-39.

111. Gao H.M., Zhang F., Zhou H. et al. Neuroinflammation and α -Synuclein Dysfunction Potentiate Each Other, Driving Chronic Progression of Neurodegeneration in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Environ. Health Perspect.* 2011; 119(6): 807-14.
112. Shimura H., Hattori N., Kubo S. et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 2000; 25(3): 302-5.
113. Kalia L.V., Lang A.E. Parkinson's disease. *Lancet* 2015; 386(9996): 896-912.
114. Rakovic A., Shurkewitsch K., Seibler P. et al. Phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1)-dependent ubiquitination of endogenous Parkin attenuates mitophagy: study in human primary fibroblasts and induced pluripotent stem cell-derived neurons. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(4): 2223-37.
115. Seibler P., Graziotto J., Jeong H. et al. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J. Neurosci.* 2011; 31(16): 5970-6.
116. de Lau L.M., Breteler M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2006; 5(6): 525-35.
117. Jiang H., Ren Y., Yuen E.Y. et al. Parkin controls dopamine utilization in human midbrain dopaminergic neurons derived from induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* 2012; 3: 668.
118. Ren Y., Jiang H., Hu Z. et al. Parkin Mutations Reduce the Complexity of Neuronal Processes in iPSC-Derived Human Neurons. *Stem Cells* 2015; 33(1): 68-78.
119. Aharon-Peretz J., Rosenbaum H., Gershoni-Baruch R. Mutations in the glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351(19): 1972-7.
120. Migdalska-Richards A., Schapira A.H. The relationship between glucocerebrosidase mutations and Parkinson disease. *J. Neurochem.* 2016; 139 Suppl 1: 77-90.
121. Corti O., Lesage S., Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol. Rev.* 2011; 91(4): 1161-218.
122. Panicker L.M., Miller D., Park T.S. et al. Induced pluripotent stem cell model recapitulates pathologic hallmarks of Gaucher disease. *PNAS USA* 2012; 109(44): 18054-9.
123. Lesage S., Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18(R1): 48-59.
124. Kang J.F., Tang B.S., Guo J.F. The Progress of Induced Pluripotent Stem Cells as Models of Parkinson's Disease. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 4126214.
125. Olszewska D.A., Fearon C., Lynch T. Novel gene (TMEM230) linked to Parkinson's disease. *J. Clin. Mov. Disord.* 2016; 3: 17.
126. Majidinia M., Mihanfar A., Rahbarghazi R. et al. The roles of non-coding RNAs in Parkinson's disease. *Mol. Biol. Rep.* 2016; 43(11): 1193-204.
127. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
128. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 2011; 12(12): 861-74.
129. Macrae I.J., Zhou K., Li F. et al. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 2006; 311(5758): 195-8.
130. Kim J., Inoue K., Ishii J. et al. A MicroRNA Feedback Circuit in Midbrain Dopamine Neurons. *Science* 2007; 317(5842): 1220-4.
131. Doxakis E. Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153. *J. Biol. Chem.* 2010; 285(17): 12726-34.
132. Junn E., Lee K.W., Jeong B.S. et al. Repression of α -synuclein expression and toxicity by microRNA-7. *PNAS USA* 2009; 106(31): 13052-7.
133. Margis R., Margis R., Rieder C.R. Identification of blood microRNAs associated to Parkinson's disease. *J. Biotechnol.* 2011; 152(3): 96-101.
134. Cardo L.F., Coto E., Mena L. et al. Profile of microRNAs in the plasma of Parkinson's disease patients and healthy controls. *J. Neurol.* 2013; 260(5): 1420-22.
135. Soreq L., Salomonis N., Bronstein M. et al. Small RNA sequencing-microarray analyses in Parkinson leukocytes reveal deep brain stimulation-induced splicing changes that classify brain region transcriptomes. *Front. Mol. Neurosci.* 2013; 6: 10.
136. Cho H.J., Liu G., Jin S.M. et al. MicroRNA-205 regulates the expression of Parkinson's disease-related leucine-rich repeat kinase 2 protein. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22(3): 608-20.
137. Minones-Moyano E., Porta S., Escaramis G. et al. MicroRNA profiling of Parkinson's disease brains identifies early downregulation of miR-34b/c which modulate mitochondrial function. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20(15): 3067-78.
138. Miller J.D., Ganat Y.M., Kishinevsky S. et al. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* 2013; 13(6): 691-705.
139. Mazzulli J.R., Xu Y.H., Sun Y. et al. Gaucher Disease Glucocerebrosidase and α -Synuclein Form a Bidirectional Pathogenic Loop in Synucleinopathies. *Cell* 2011; 146(1): 37-52.

Поступила: 30.11.2016