

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет  
физико-математических  
и естественных наук

Кафедра  
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.03.01 Биология  
Профиль подготовки Биохимия  
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

«АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОВ НА  
РАННИХ СТАДИЯХ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА»

Студент Верещин Верещин Михаил Валерьевич

Руководитель Гамзин Гамзин С.С.

Нормоконтролер Кручинина Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 15.06.19 № 16)

Заведующий кафедрой Карпова Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 15.06.19 № 1)

Секретарь ГЭК Клыченков Клыченков С.В.

Пенза, 2019

## Содержание

|                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Список сокращений .....                                                                                                                                         | 3  |
| ВВЕДЕНИЕ .....                                                                                                                                                  | 4  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                                                                 | 7  |
| 1.1 Эпидемиология болезни Паркинсона .....                                                                                                                      | 7  |
| 1.2 Методы диагностирования болезни Паркинсона .....                                                                                                            | 9  |
| 1.3 Генетический вклад в этиологию Болезни Паркинсона .....                                                                                                     | 12 |
| 1.4 Патогенез болезни Паркинсона в мозговых структурах.....                                                                                                     | 16 |
| 1.5 Молекулярно-генетические основы патогенеза .....                                                                                                            | 17 |
| 1.6 Исследования транскриптома при болезни Паркинсона .....                                                                                                     | 21 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....                                                                                                                  | 23 |
| 2.1 Характеристика анализируемых выборок. ....                                                                                                                  | 23 |
| 2.2 Выделение РНК из крови .....                                                                                                                                | 23 |
| 2.3 Подбор праймеров и зондов для ПЦР в реальном времени с<br>использованием системы TaqMan .....                                                               | 24 |
| 2.4 Реакция обратной транскрипции.....                                                                                                                          | 25 |
| 2.5 Полимеразно-цепная реакции.....                                                                                                                             | 26 |
| 2.7 Валидация подобранных TaqMan систем для полимеразной цепной<br>реакции в реальном времени.....                                                              | 28 |
| 2.8 Статистический анализ данных .....                                                                                                                          | 28 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....                                                                                                           | 30 |
| 3.1 Отбор генов-кандидатов болезни Паркинсона .....                                                                                                             | 30 |
| 3.2 Подбор и проверка TaqMan систем для полимеразной цепной реакции в<br>реальном времени .....                                                                 | 30 |
| 3.3 Анализ изменения уровней мРНК генов-кандидатов в периферической<br>крови пациентов с болезнью Паркинсона, находящихся на ранних стадиях<br>заболевания..... | 41 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....                                                                                                                                                | 50 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....                                                                                                                                          | 52 |

## Список сокращений

БП – Болезнь Паркинсона

ЦНС – центральная нервная система

ДА – дофамин

АД – аутосомно-доминантный

АР – аутосомно-рецессивный

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

МММ – мембрана, ассоциированная с митохондриями

ЭФ – электрофорез

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – Комплементарная Дезоксирибонуклеиновая кислота

АТФ – Аденозинтрифосфат

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время изучению работы мозга посвящено большое количество работ. Особую ценность в таких работах представляют изучения болезней затрагивающих не всю нервную систему в целом а одну из составных частей этой сложной структуры, чтобы точнее установить ее роль в функционировании всей сложной системы. Одной из таких болезней является болезнь Паркинсона (БП).

Болезнь Паркинсона, или первичный паркинсонизм, представляет собой системное, медленно прогрессирующее (5-20 лет), хроническое заболевание характерное для лиц старшей возрастной группы, которое на начальных стадиях сопровождается гибелью дофаминергических нейронов, что приводит к таким основным симптомам как:

- мышечная ригидность
- гипокинезия
- тремор
- постуральная неустойчивость

Болезнь Паркинсона – это патологическое состояние, которое развивается под действием генетических факторов и факторов окружающей среды, в ходе которого гибнут нейронные структуры, вызывая необратимые последствия в структурах ЦНС, а преимущественно в дофаминергической системе. Данная болезнь на сегодняшний день считается неизлечимой.

На последних стадиях БП приводит к нарушению работы таких нейромедиаторных систем как холинергическая, серотонинергическая, норадренергическая, ГАМК-ергическая и глутаматергических система, что в итоге приводит к таким вторичным вегетативным симптомам как нарушение перистальтики желудочно-кишечного тракта, или к таким психическим расстройствам как тревога, депрессия и снижение когнитивных функций.

Таким образом, БП на последних стадиях затрагивает практически все отделы нервной системы, что обуславливает сложную и клинически гетерогенную картину проявлений данного заболевания.

Сложность изучения данной болезни состоит в том, что при постановке диагноза на основе проявления моторных признаков, в мозговых структурах уже успевают происходить сильные изменения. Так, например, в черной субстанции на момент постановки диагноза, успевает погибнуть примерно половина нейронов, что приводит к сильному падению уровня дофамина в базальных ганглиях. Эти изменения приводят к изменениям в других нейромедиаторных системах, что усложняет картину патогенеза БП.

Болезнь Паркинсона является одним из самых быстро растущих по численности неврологических расстройств в мире. С 1990 по 2015 год число людей с БП удвоилось и составило более 6 миллионов и со временем данная цифра неуклонно растет. Подвержены данной болезнью в основном лица старше 65 лет. В связи с ростом численности населения, а также со увеличением старения населения проблема ранней диагностики и актуальность исследования данного заболевания возрастает.

Этиология БП обычно описывается сочетанием генетических и экологических факторов. В совокупность генетических факторов включают все виды генетических мутаций приводящих к развитию БП.

В настоящее время активно проводятся исследования изменения уровня транскриптома на разных стадиях болезни Паркинсона. Большинство таких работ выполнены при исследовании пациентов, находящихся на поздних стадиях развития заболевания. В связи с этим актуальным является изучение максимально ранних стадий развития патологии, например, исследование пациентов с БП, находящихся на ранних клинических стадиях заболевания, подвергавшихся и не подвергавшихся лечению.

При этом наиболее доступной тканью для исследования является периферическая кровь. В периферической крови находятся лимфоциты, которые экспрессируют ферменты и рецепторы, характерные для

дофаминергических нейронов. Это позволяет применять периферическую кровь как модель для исследования транскриптома при БП, для выявления изменения относительных уровней экспрессии отдельных генов.

В дальнейшей перспективе такие исследования станут основой составления диагностической панели ранней диагностики БП.

Таким образом, проведение данной работы имеет как фундаментальное значение, позволяющее лучше понять механизмы БП и уточнение картины патогенеза данного заболевания, так и прикладное, нацеленное на улучшение ранней диагностики БП.

**Целью** данной работы является изучение изменения экспрессии генов в периферической крови у пациентов с ранними клиническими стадиями болезни Паркинсона.

**Задачи работы:**

1. Поиск новых генов-кандидатов БП на основе данных литературы.
2. Подбор праймеров и зондов TaqMan для предполагаемых генов-кандидатов БП.
3. Анализ изменения относительных уровней мРНК генов, отобранных на основе данных литературы, в периферической крови пациентов с БП, находящихся на самых ранних клинических стадиях заболевания.

Выпускная квалификационная работа написана на 59 листах, содержит 14 таблиц, 14 рисунков и список литературы на русском и английском языках из 86 источников.

# **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

## **1.1 Эпидемиология болезни Паркинсона**

Болезнь Паркинсона, или первичный паркинсонизм — это заболевание нервной системы, которое в большинстве своем распространено среди пожилого населения, характеризующееся гибелью дофаминергических nigrostriatalных нейронов в черной субстанции, что вызывает нарушение моторных функций. Эти нарушения, в свою очередь, ведут к глубокой инвалидации пациента.

Болезнь Паркинсона, или первичный паркинсонизм является следствием генетической предрасположенности индивида, который может быть носителем аутосомно-доминантной или аутосомно-рецессивной мутации в генах, мутации в которых приводят к развитию данной болезни.

Помимо первичного паркинсонизма существует вторичный паркинсонизм который обусловлен воздействием ряда факторов окружающей среды, таким как химические агенты и черепно-мозговые травмы.

Так же есть такое явление как синдром паркинсонизма, которое представляет собой проявление симптомов характерных для БП. Но нужно отметить что данные симптомы зачастую не связаны с нейродегенеративными изменениями в мозге а вызваны например химическими веществами вызывающими кратковременное проявление данных моторных признаков, как в случае действия блокаторов дофаминовых рецепторов (лекарственный паркинсонизм).

В рамках данного исследования мы будем изучать первичный паркинсонизм, который по разным данным составляет до 80% случаев всех случаев БП.

Число пациентов с БП с каждым годом неуклонно растет. По прогнозам, к 2040 году число людей с болезнью Паркинсона во всем мире превысит 12 миллионов [24]. Данная тенденция складывается из-за наложения таких факторов как: Увеличивающаяся продолжительность жизни и улучшение методов диагностики данного заболевания [35,37], рост индустриализации совместно с ухудшением экологической обстановки. Показатели распространённости БП в мире приведены в таблице 1.

*Таблица 1 – Общая распространённость БП в мире [84].*

| <b>Регион</b>    | <b>Количество случаев БП на 100 000 населения</b> |
|------------------|---------------------------------------------------|
| Европа           | 142                                               |
| Северная Америка | 195                                               |
| Южная Америка    | 265                                               |
| Азия             | 256                                               |
| Африка           | 30                                                |
| Австралия        | 260                                               |

БП в большинстве случаев начинает проявляться у лиц старше 65 лет [70] и чем старше человек, тем больше вероятность заболеть данной болезнью. риск развития данной болезни к 60 годам составляет 1%, а риск развития после 80 лет составляет 4% [36, 84]. Так как население мира стареет, это все приводит к росту числа людей с болезнью Паркинсона. По прогнозам ВОЗ к 2050 год количество больных БП возрастет в 4 раза. И хотя в группу риска данной болезни входят так же люди более молодого возраста [67,84], БП все-таки является возрастной болезнью, что возможно подтверждается данными о более частой встречаемости данной болезни в тех регионах, где низкий средний возраст человека, например в африканском регионе (Таблица 1).

Причины, по которым БП ассоциирована с возрастом является следствием нескольких накладывающихся друг на друга факторов:

- хронический окислительный стресс;
- накоплением мутаций митохондриальной ДНК;
- падение уровня компонентов антиоксидантной защиты;
- угнетение функции убиквитин-протеасомной системы;
- снижение способности нейронов к активизации стрессорного ответа.

Все эти факторы в конечном итоге приводят не только к предрасположенности человека к БП, но и к ряду других болезней нервной системы.

В России распространенность болезни составляет 19,8– 169,4 человек на 100000 лиц (от 19,8 Смоленск, Центральный р-н до 169,4 Иркутская обл. на 100 тыс. человек ) [9,10]. А в общем количество больных в России составляет по оценкам исследований, проведенных в период с 2005–2015 г примерно 210000 человек [19].

## **1.2 Методы диагностирования болезни Паркинсона**

БП является медленно прогрессирующим заболеванием, и до момента проявления классических моторных признаков обычно проходит большое количество времени (5-20 лет). До проявления классических моторных проявлений у человека могут проявляться различные психические нарушения(снижение внимания, работоспособности, ослабление когнитивных функций), нарушения в вегетативных функциях (запоры, слюнотечение), нарушения в сенсорных функциях (спонтанное чувство онемения, ухудшения обоняния), или нарушение в режима сна и бодрствования.

На сегодняшний день БП классифицируют по формам (таблица 2), скорости прогрессирования (таблица 3), стадиям (таблица 5), этиологии, и возрасту пациента (таблица 4).

*Таблица 2 – Классификация болезни Паркинсона по характеру моторных нарушений[1].*

| форма                    | распространенность |
|--------------------------|--------------------|
| Акинетико-ригидная форма | 15-20%             |
| Дрожательная форма       | 5-10%              |
| смешанная                | 60-70%             |

*Таблица 3 – Классификация по темпу прогрессирования[1].*

| Темп прогрессирования | Скорость смен стадий                                                                                   |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Быстрый               | смена стадий заболевания (первая → вторая или вторая → третья) происходит в течение 2-х или менее лет; |
| Умеренный             | смена стадий происходит более чем за 2 года, но не более чем за 5 лет;                                 |
| Медленный             | смена стадий более чем через 5 лет                                                                     |

*Таблица 4 – Классификация по времени возникновения первых классических признаков [1].*

| форма      | время возникновения основных признаков |
|------------|----------------------------------------|
| ювенильная | 20-40 лет                              |
| Обычная    | 55-65                                  |
| поздняя    | 65 и более                             |

Особое место среди всех классификаций БП имеет классификация по стадиям. Для определения стадии болезни пользуются различными шкалами, такими как:

- 1) шкала Хен и Яра в которой выделяют 5 стадий развития болезни на основе проявления моторных дисфункций (таблица 5);
- 2) шкала Браака, которая была составлена на основе проявления классических моторных дисфункций и немоторных проявлениях(потеря

обоняния, сонливость, депрессия) и таких гистологических изменений как наличие ТЛ в тех или иных структурах ЦНС;

*Таблица 5– Стадии болезни Паркинсона по шкале Хен и Яра*

| Стадия | симптомы                                                                                                                 |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0      | Двигательные проявления отсутствуют                                                                                      |
| 1      | Симптомы проявляются на одной из конечностей                                                                             |
| 1.5    | Симптомы проявляются на одной из конечностей и туловище                                                                  |
| 2      | Двусторонние проявления без проявления постуральной неустойчивости                                                       |
| 2.5    | Двусторонние проявления с постуральной неустойчивостью; больной способен преодолевать инерцию движения вызванную толчком |
| 3      | Двусторонние проявления с постуральной неустойчивости. Больной способен к самообслуживанию                               |
| 4      | Обездвиженность, потребность в посторонней помощи. При этом больной способен ходить и/или стоять без поддержки           |
| 5      | Больной прикован к креслу или к кровати. Тяжелая инвалидизация                                                           |

3) международная унифицированная оценочная шкала БП (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS), которая представляет собой опросник, которым руководствуется исследователь для проведения теста с пациентом, в ходе которого определяется не только наличие или отсутствие широкого спектра моторных дисфункций(слюнотечение, почерк, тремор, застывание), но и наличие различного рода психических(галлюцинации, апатия, тревога, психоз, бессонница), когитивных(речь, подчерк, запоминание) и вегетативных нарушений (нарушение мочеиспускания, запоры).

При увеличивающемся количестве пациентов с БП, возрастает важность разработки новых методов диагностирования и исследования данной болезни. Сейчас клинические исследования БП пополнились такими методами как: позитронно-эмиссионная томография, однофотонная эмиссионная компьютерная томография, магнитно-резонансная томография

и магнитно-резонансная спектроскопия с помощью которых оценивают состояние ДА-нейронов, локализованных в черной субстанции промежуточного мозга [23, 33,53].

По финансово техническим причинам проведение данных процедур достаточно затруднено для обычной потоковой диспансеризации, поэтому разумно будет перед назначением пациенту данных процедур, выявить группы риска с помощью более доступных методов, таких как анализ крови.

Анализировать изменение транскриптома при БП можно не только на тканях различных мозговых структур, но так же и в периферической крови, при этом данный вид исследований является весьма перспективным направлением в диагностике БП. В ходе исследования БП были получены данные об изменении транскриптомного профиля, которые могут послужить хорошей материальной базой для составления диагностической панели для пациентов, которая в будущем может быть использована при диспансеризации населения.

Для выявления механизмов прогрессирования болезни и ее зарождения особое значение имеет изучение транскриптома на ранних стадиях. Потому как на поздних стадиях патологические изменения в дофаминергической нейромедиаторной системе могут привести к сильным изменениям в других системах, например ГАМК-ергической, серотонинергической, глутаминергической, которые в свою очередь будут приносить помехи в результаты исследований.

### **1.3 Генетический вклад в этиологию Болезни Паркинсона**

У каждого пациента этиологию болезни как фенотипический признак будет определять совокупность генетической предрасположенности и всего многообразия факторов окружающей среды.

В ряде исследований с монозиготными и дизиготными близнецами была продемонстрирована высокая конкордантность нейродегенеративного

процесса у близнецов, что подтвердило роль наследственности в этиологии БП [66].

Так же наследственный характер развития БП был установлен при большом количестве популяционных и эпидемиологических исследований. Например у 10-24% всех больных в этих исследованиях имелись родственники с БП. А риск возникновения у родственников первой степени родства варьируется от 4 до 10 % и в среднем больше общепопуляционного [46, 73, 84].

Особенно явно прослеживалась тенденция повышения риска заболевания у пациента, в семье которого наследование данного признака наблюдалось по аутосомно-доминантному типу с мутацией в таких генах как: *SNCA*, *VPS35*, *CHCHD2*, *LRRK2*, или аутосомно-рецессивному типу с мутацией в таких генах как: *ATP13A2*, *DJ-1*, *PINK1*, *Parkin*. Такие формы данной болезни называются - семейные формы БП. Именно они позволили установить на ранних этапах исследования БП основные гены и соответственно белковые продукты данных генов, которые участвуют в патогенезе болезни Паркинсона [7,50,62, 65].

При этом мутации генов могут быть не только в кодирующей части гена, но и в промоторной его части как например динуклеотидный Rep1-полиморфизм в промоторной области гена *SNCA* который повышают риск БП в 1,4 раза (данный вид мутации промотора повышает экспрессию гена, что сопровождается увеличением концентрации  $\alpha$ -синуклеина и его повышенной агрегацией в клетке) [6].

На сегодняшний день можно уже выделить ключевые гены участие которых подтвердилось исследованиями моногенных форм БП, которые приводят к значительному увеличению риска развития болезни. Некоторые из этих генов представлены в Таблице 6. Продукты этих генов функционируют в таких системах клетки как: система митохондриального биогенеза, система везикулярного транспорта, системы лизосомальной и нелизосомальной деградация белка.

По разным данным, генетические факторы объясняют причины данной болезни по крайней мере у четверти больных. Вклад моногенных форм заболеваний в общую популяцию больных БП составляет 5-7% [62], соответственно остальную часть генетического вклада занимают спорадические формы.

Таблица 6 – гены, и кодируемые ими белки идентифицированные для БП.

| Гены/белок                                     | Тип наследования | Предполагаемая функция                                                                                                                                                                                            | Участие в таких патологических процессах как:                                                                                                                               |                                  |
|------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <i>SNCA</i> /α-синуклеин                       | АД*              | Пресинаптический белок участвующий в везикулярном транспорте, процессах экзо- и эндоцитоза, также участвует в внутриклеточном распределении митохондрий, регулирует взаимодействия типа белок-белок и белок-липид | нарушения в работе протеасомной деградации белка, нарушение в работе и функционирования митохондрий, нарушение в работе лизосомальной аутофагии, и везикулярного транспорта | [29, 38, 39, 48, 50, 72, 78, 82] |
| <i>Parkin</i> /убиквитин-Е3-лигаза             | АР*              | Участвует в убиквитинировании белков-мишеней (поврежденные белки, индукторы и репрессоры генов)                                                                                                                   | нарушения в работе протеасомной деградации белка и системы биогенеза митохондрий                                                                                            | [27, 56, 71]                     |
| <i>PINK1</i> /серин, треониновая протеинкиназа | АР               | воспринимает сигнал о повреждении митохондрии для вовлечения данной митохондрии в процесс митофагии                                                                                                               | накопление в клетке поврежденных митохондрий                                                                                                                                | [56]                             |
| <i>DJ-1</i> /белок DJ1                         | АР               | Шаперон, антиоксидант                                                                                                                                                                                             | Нарушение в работе антиоксидантной защиты, накопление ТЛ                                                                                                                    | [60, 75]                         |

|                                                                        |    |                                                                                                             |                                                                                             |                   |
|------------------------------------------------------------------------|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| <i>ATP13A2</i> /лизосомальная АТФаза                                   | АР | Лизосомальная АТФаза играет роль в сортировке поврежденных белков клетки в лизосомах                        | дисфункция данного гена приводит к накоплению лизосом с поврежденными белками внутри клетки | [15,26,54,59,61]  |
| <i>GBA</i> /бета-глюкоцереброзидаза                                    | -  | Лизосомальная деградация белков                                                                             | накопление белковых агрегатов внутри клетки                                                 | [43,52,74,83]     |
| <i>VPS35</i> /вакуолярный белок VPS35                                  | АД | Транспорт везикул в обоих направлениях от КГ до плазматической мембраны, слияние и фрагментации митохондрий | Нарушение везикулярного транспорта. повреждение митохондрий                                 | [5,6,16,19,56,77] |
| <i>CHCHD2</i> /Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2 | АД | предотвращает развитие окислительного стресса                                                               | Нарушение в работе антиоксидантной защиты                                                   | [11, 56]          |
| <i>LRRK2</i> / дардадин                                                | АД | Участвует в слиянии и делении митохондрий, и формировании везикул                                           | Повреждение митохондрий, и нарушение механизма везикулярного транспорта                     | [20, 56, 60]      |

\*АР - аутосомно-рецессивная форма БП, АД - аутосомно-доминантная форма БП

Как видно из Таблицы 6, эти гены могут вызывать как аутосомно-доминантные, так и аутосомно-рецессивные формы болезни Паркинсона, но так же есть и такие формы мутаций, которые не подчиняются данным законам, но значительно увеличивают риск развития болезни, как например ген *GBA*, который не обязательно, но может значительно повышать риск развития заболевания, что ведёт к развитию болезни Паркинсона, существенно снижающую качество и уровень жизни больных.

#### **1.4 Патогенез болезни Паркинсона в мозговых структурах.**

В результате гибели nigrostriatalных нейронов дофаминергической афферентной системы происходит разобщение механизмов поддержания нейронального круга регулирующего координацию движения (рис. 1).

Проекции ДА-нейронов nigrostriatalной системы модулируют моторный функциональный контур, в который входят такие нейрональные круги как - прямой и обратный путь.

Прямой и обратный путь – это группы тормозных и возбуждающих нейронов, локализованных в различных областях экстрапирамидной системы, которые ответственны за регуляцию активности таламокортикальных нейронов, которые поддерживают активность различных сенсомоторных областей коры. Через прямой путь осуществляется положительная связь (поддерживается активность коры) а через непрямой – отрицательная (тормозится активность коры).

ДА-нейроны локализующиеся в компактной части черной субстанции образуют синаптические связи с нейронами вовлеченными в прямой и обратный путь, где они действуют на 2 типа рецепторов D1 и D2.

Рецепторы D1 активирует прямой путь а D2 ингибируют обратный путь [78]. То есть дофамин, активируя прямой и блокируя обратный путь и тем самым поддерживает активность моторных зон КБП через возбуждение таламокортикальных нейронов (рис. 1).

В условиях болезни Паркинсона происходит значительная утрата нейронов компактной части чёрной субстанции, что приводит к нарушению подачи сигнала от зоны черной субстанции к стриатуму, что в итоге приводит к различным проявлениям моторных дисфункций.



Паркин – это белок, который отмечает белки-мишени убиквитином, чтобы протеасома могла узнать данный белок и подвергнуть его деградации (рис. 2).

Так же нужно отметить, что белок  $\alpha$ -синуклеин является одним из основных субстратов паркина.

Различные мутации в гене  $\alpha$ -синуклеина, приводящие к усиленной его экспрессии или изменении его конформации, приводят к усилению его агрегационных свойств, что способствует формированию белковых агрегатов и апоптозу клетки [48,78] потому что в таких условиях протеолитическая система деградации белка не сможет обеспечить должную скорость утилизации данных белковых образований. Еще  $\alpha$ -синуклеин в свою очередь может проявлять ингибирование самого процесса убиквитин-зависимого протеолиза [39]. Агрегированный  $\alpha$ -синуклеин связывается с одной из субъединиц протеасомы, тем самым препятствует взаимодействию убиквитинированного белка с протеасомным комплексом [71].

#### *Нарушения в функционировании митохондрий.*

В число нарушений функционирования митохондрий входят такие патологические процессы как: нарушение биогенеза митохондрий, нарушение в процессах деления и слияния митохондрий, нарушения в связывании митохондрий с ЭПР, и регуляции митохондриального биогенеза.

Немаловажная функция в системе биогенеза отведена белку паркину. Паркин регулирует численность митохондрий и участвует в обновлении митохондриона [56]. При помощи белка *PINK1* который улавливает сигналы повреждения митохондрий и передает этот сигнал паркину, путем его фосфорилирования, который затем убиквитинирует белки митохондрий, что приводит в дальнейшем к аутофагии митохондрии (рис. 2). Еще белок паркин убиквитинирует белок *PARIS* который является ингибитором активатора митохондриального биогенеза *PGC1- $\alpha$* .

Белок дардарин (ген *-LRRK2*) (рис. 2) в норме участвует в деградации повреждённых митохондрий. Он фосфорилирует динамин-связанный белок

(DRP-1), который локализуется на мембране митохондрий, что в конечном итоге приводит к фрагментации поврежденной митохондрии. Однако при соответствующей мутации в гене дарадина (G2019), последний начинает фосфорилировать динамин-связанный белок на здоровых митохондриях, что приводит к их делению [56,60].

Белок DJ-1 локализуемый в митохондриях [60], оказывает защиту от токсического воздействия окислительного стресса [75], а также действует как окислительно-восстановительный шаперон для  $\alpha$ -синуклеина, препятствуя его полимеризации [60].

Вакуолярный белок VPS35 (рис. 2) играет роль в слиянии и фрагментации митохондрий [56]. Повышение экспрессии данного белка в мутантных линиях мышей приводило к усиленной фрагментации митохондрий и гибели клеток [77].

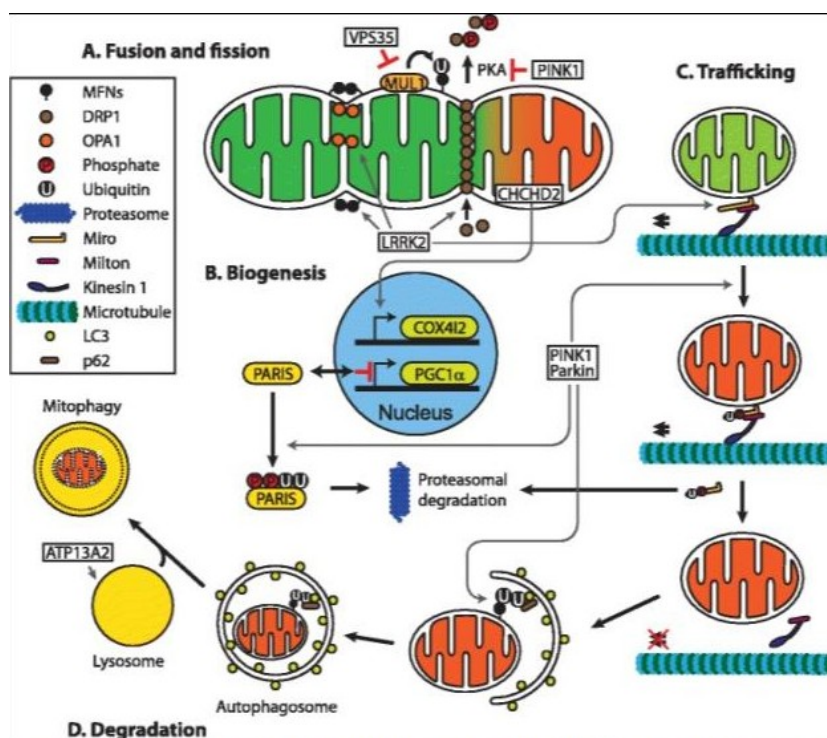


Рисунок 2. Белки вовлеченные в патогенез БП, и их роль в биогенезе и функционировании митохондрий. А- слияние и фрагментация митохондрий В- биогенез митохондрий С- транспорт митохондрий D- деградация митохондрий [56].

Продукт гена *CHCHD2* (рис 2) это межмембранный белок который может локализоваться в митохондриях или в ядре. В митохондриях он находится в связанном состоянии с комплексом IV [1]. Снижение экспрессии данного белка приводит к понижению активности комплекса IV что в конечном итоге приводит к увеличению продукции активных форм кислорода, и фрагментации митохондрий [56].

Так же в последнее время появились данные о том что а-синуклеин играет роль в связывании митохондрий с участком ЭПР, который называется «мембрана ассоциированная с митохондриями» (МАМ). Этот участок образует границу между митохондрией и ЭПР. Повышенная экспрессия гена а-синуклеина может приводить к усложнению связывания митохондрий с МАМ, за счет блокирования сайтов связывания митохондрии с соответствующим участком ЭПР [50].

#### *Нарушения Везикулярного транспорта.*

В везикулярном транспорте задействовано большое количество белков, и нарушение работы каждого из них может потенциально стать фактором риска развития БП. Здесь опять нужно упомянуть а-синуклеин, так как он локализуется в пресинаптических образованиях и участвует там в процессах эндо- и экзоцитоза [38].

Белок дандарин участвует в формирование эндосом на постсинаптической мембране нейронов [20].

Вакуолярный белок VPS35 входит в состав гетеропентамерного комплекса (ретромер), который осуществляет везикулярный транспорт от комплекса гольджи до плазматической мембраны в обоих направлениях, и играет роль в рециркуляции трансмембранных белков [85], и их лизосомальной деградации, в том числе а-синуклеина [79].

#### *Нарушения в работе лизосомальной деградации белка*

Лизосомная деградация белка – это неспецифический процесс утилизации крупных белковых агрегатов и мембранно-связанных белковых комплексов. В лизосомной деградации участвует большое количество

ферментов протеолиза, которые потенциально могут быть генами риска БП. В частности есть данные о белке глюкоцереброзидазе, кодируемым геном *GBA*, согласно которым мутации в соответствующем гене могут привести к нарушению процессов лизосомальной деградации в клетке и в следствии привести к накоплению в ней белковых агрегатов [43,52,83,74].

Еще в нарушении процесса лизосомной деградации белка могут быть задействованы нарушения в работе гена *ATP13A2*, который кодирует лизосомную АТФазу [15,26,54,59]. Это белок играет огромную роль в гомеостазе клетки осуществляя сортировочную роль для белков, которые должны в дальнейшем подвергнуться экзоцитозу. Мутации в гене данного белка в исследованиях приводила к накоплению белковых включений цитоплазмы и повышению загруженности системы протеасомной деградации белка [61].

## **1.6 Исследования транскриптома при болезни Паркинсона**

Генетические факторы как мутации генов риска развития БП описывает не всю причинность возникновения и патогенеза данного заболевания. Поэтому наиболее перспективным в данном плане из исследований механизмов возникновения и протекания БП является изучение изменения транскриптома. В настоящее время было проделано большое количество работ по изучению транскриптома постмортальных тканей пациентов [17-19,21,32,34,69] но изучение этого материала связано со следующими проблемами.

Зачастую пациенты, входящие в выборку в данных исследованиях, находились на момент смерти на последних стадиях развития БП и вероятнее всего проходили медикаментозное лечение. Так же проходит достаточно большое количество времени между такими событиями как смерть пациента и выделение РНК из постмортального материала, что тоже привносит изменения в результаты работы.

Для того, чтобы исследовать уровень представленности транскрипта генов человека, потенциально задействованных в патогенез заболевания, лучше всего использовать метод с минимальной инвазивностью чтобы облегчить процесс сбора проб для выборки у живых пациентов на самых ранних стадиях БП. Таким методом является исследование транскриптома в периферической крови [54,61,74,78,83].

Клетки крови, а именно лимфоциты, экспрессируют такие белки, свойственные дофаминергическим нейронам как: мембранный переносчик ДА, рецептор дофамина, ферменты синтеза дофамина и многие другие гены характерные для нервных клеток в целом, что позволяет использовать периферическую кровь как модель для изучения изменения транскриптома при БП [14].

Для пополнения списка генов, которые потенциально могут быть вовлечены в развитие БП, проводят полнотранскриптомные анализы, в ходе которых находят гены кандидаты на роль в патогенезе БП. В 2007 году такой анализ выявил 7 дифференциально экспрессирующихся генов (VDR, HIP2, CLTB, FPRL2, CA12, CEACAM4, ACRV1 и UTX) по сравнению со здоровым контролем [54] в дальнейшем было найдено еще 4 потенциальных биомаркера БП (PSMA2, LAMB2, ALDH1A1 и HIST1H3E) и в этой же работе было открыто еще 2 гена интереса (HIP2 и HSPA8), но как оказалось, в последующих экспериментах уровень транскрипта этих генов в периферической крови не коррелировал с уровнем транскрипта в черной субстанции.

Пополнение списка генов, которые вовлечены патогенез БП происходит до сих пор. Помимо полнотранскриптомных исследований перспективным направлением исследования является изучение изменения транскриптома отдельных генов на самых ранних стадиях заболевания у пациентов с БП.

В данном исследовании будет проанализировано изменение транскриптома в периферической крови, так как этот метод наиболее хорошо подходит для целей исследования, а именно изучения вариативности транскриптов на ранних стадиях БП.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Характеристика анализируемых выборок.**

В данном исследовании были проанализированы следующие выборки:

- 47 пациентов с недавно поставленным диагнозом – БП (1-2 стадия). Диагноз ставили на основе международной унифицированной оценочной шкалы БП (Unified Parkinson's Disease Rating Scale, UPDRS) [25] и шкалы Хен и Яра [30] в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научный центр неврологии», г. Москва.

В выборку с болезнью паркинсона входили как пациенты которые проходили медикаментозное лечение и которые получали различные препараты в виде монотерапии либо в виде комбинации препаратов (агонисты ДА-рецепторов: прамипексол в дозировке 1,5 мг/день или пирибедила в дозировке 150 мг/сут, L-допа в дозировке 150-200 мг/сут, амантадин в дозировке 300 мг/день) так и пациенты не принимавшие препараты.

- 23 пациента с различными неврологическими заболеваниями (боковой амиотрофический склероз, болезнь Мари-Шарко, болезнь Вильсона-Коновалова, мозжечковая атаксия и др.).обоих полов в возрасте от 30 до 70 лет.

- 44 неврологически здоровых добровольцаобоих полов в возрасте от 30 до 70 лет.

Все больные и неврологически здоровые добровольцы были русскими по происхождению были отобраны в Научном центре неврологии, г. Москва. Все образцы крови были взяты с информированного согласия исследуемых лиц.

### **2.2 Выделение РНК из крови**

Для выделения тотальной РНК из цельной крови человека забор крови

осуществляли в 8 часов утра натошак, затем хранили до выделения не более 2 часов при +4 °С.

Объём образца для выделения составлял 200 мкл. Выделение производили с помощью коммерческого набора ZR Whole-BloodTotal RNA Kit™ («ZymoResearchCorp.», США) согласно рекомендациям производителя.

Концентрацию выделенной тотальной РНК измеряли с помощью набора Quant-iT RNA BR AssayKit и флуориметра Qubit 3.0 («Invitrogen», США). Качество полученной РНК оценивали при помощи набора Experion™ RNA HighSensAnalysisKit и системы TheExperionsystem («Bio-Rad», США).

### **2.3 Подбор праймеров и зондов для ПЦР в реальном времени с использованием системы TaqMan**

При подборе праймеров использовали последовательности мРНК исследуемых генов в базе GeneNCBI [45]. В описании искомого гена выбирали мажорный транскрипт мРНК. При наличии альтернативных транскриптов подбор праймеров осуществлялся только на те экзонные спайки, которые присутствуют во всех транскриптах мРНК данного гена.

Для подбора праймеров и зондов была использована программа BeaconDesigner 7.0 «Premier Biosoft International» (PaloAlto, USA) с использованием следующих параметров подбора систем праймеры-зонд:

- Прямой и обратный праймер должны располагаться по обе стороны от участка экзонной спайки - место сшивания двух соседних экзонов после вырезания интрона. Длина вырезанного интрона должна быть более 1000 нуклеотидов.
- Длина праймеров и зондов от 18 до 30 нуклеотидов.
- Праймеры и зонды должны быть специфичными. То есть садится только на интересующий нас транскрипт и не садится на геном и другие не интересующие нас транскрипты данного организма и желательно других организмов исследования которых проводятся в лаборатории. Для

определения длины интронов в геноме использовался ресурс Ensemblgenomebrowser 91 [22].

- Проверка специфичности праймеров и зонда осуществлялась с использованием ресурса Primer3 and BLAST [41], используя базу RefSeqRelease 86 [58].
- GC-состав праймеров (процентное соотношение между количеством оснований гуанина и цитозина и количества всех оснований) не должен превышать 55%.
- Температура отжига праймеров должна быть порядка 60 °C (от 59 °C до 61 °C), а зонда – на 10 °C ( $\pm 3$ ) выше.
- Разница между температурами отжига прямого и обратного праймеров должна быть менее 1 градуса.
- Длина полученного продукта должна быть в пределах от 85 до 135 нуклеотидов.
- Расстояние между каждым из праймеров и зондом должно быть не менее 6 нуклеотидов.
- Значения dG (изменение энергии Гиббса) у селф- и кросс-димеров и шпилечных структур, образуемых данными праймерами не должны превышать по модулю 3 kcal/mole согласно BeaconDesigner.

Далее проводится экспериментальная проверка отжига и специфичности праймеров (без зонда) с использованием рутинной ПЦР и гель-электрофореза (ЭФ).

## **2.4 Реакция обратной транскрипции**

После выделения РНК из крови, РНК должна пройти стадию обратной транскрипции (процесс синтеза одноцепочечной кДНК на матрице одноцепочечной РНК) для того чтобы полученная в ходе этой стадии кДНК могла быть использована в качестве матрицы в ПЦР.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора

RevertAid™ H MinusReverseTranscriptaseKit («Fermentas», Литва) в соответствии с рекомендациями производителей. В таблице 7 представлен состав RT-смеси, где RT+ - обратная транскрипция синтеза первой цепи с мРНК исследуемого гена, а RT- - отрицательный контроль проведения реакции обратной транскрипции.

*Таблица 7 – Состав реакционной смеси для реакции обратной транскрипции.*

|                                         |                                         |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------|
| РНК – 10 мкл                            | РНК – 10 мкл                            |
| 5X Буфер – 4 мкл                        | 5X Буфер – 4 мкл                        |
| дезоксирибонуклеотиды 10 мМ – 2 мкл     | дезоксирибонуклеотиды 10 мМ – 2 мкл     |
| тРНК дрожжей, 100 нг/мкл – 2 мкл        | тРНК дрожжей, 100 нг/мкл – 2 мкл        |
| Праймеры* – 1 мкл                       | Праймеры* – 1 мкл                       |
| Ингибитор рибонуклеаз 20 ед/мкл – 1 мкл | Ингибитор рибонуклеаз 20 ед/мкл – 1 мкл |
| Ревертаза 200 ед/мкл – 1 мкл            | –                                       |

В качестве праймеров была использована смесь Random и OligodT праймеров в соотношении 3:2.

Эти праймеры должны в реакционной смеси комплементарно, на сколько это возможно, связываться с транскриптами. Добавление праймеров OligodT обусловлено тем, что праймеры будут преимущественно связываться с 3'-концом транскрипта, а точнее в районе поли(А)-хвоста. Таким образом, мы повысим выход кДНК соответствующие кодирующей части гена, с которыми в дальнейшем в ходе ПЦР сможет взаимодействовать наша система из праймеров и зонда.

## 2.5 Полимеразно-цепная реакции

Для экспериментальной проверки праймеров (без зонда) проводится рутинная ПЦР.

В состав 30 мкл реакционной смеси входило:

- 12,7 мкл воды MQ;

- 5 мкл кДНК (0,02 нг/мкл);
- 3 мкл ПЦР-буфер (10х);
- 3 мкл 25 mM MgCl<sub>2</sub>;
- 3 мкл смеси праймеров и зонда \*;
- 3 мкл смеси dNTP;
- 0,3 мкл SynTaq ДНК-полимеразы (5 ед/мкл).

\*Смесь праймеров и зонда собиралась согласно рекомендациям производителя: 10 пМ каждого праймера (Forward – прямой, Reverse – обратный), 2,5 пМ зонда.

Температурный цикл, использованный в данном эксперименте:

- 1) 50°C - 1 минута. (holdstage).
- 2) 95 °C - 15секунд. (PCR STAGE).
- 3) 61°C - 30секунд. (PCR STAGE).
- 4) 25°C - 30 секунд.(holdstage).

Стадии 3-4 повторяются 40 циклов.

## 2.6 Электрофорез в агарозном геле

В работе использовался гель с концентрацией агарозы 2%. Выбор концентрации агарозы зависит от длины исследуемых фрагментов ДНК. 2% гель подходит для разделения образцов длиной 50-1500 пар оснований.

В состав 400 мл геля для ЭФ входило:

- 392 мл дистиллированной воды;
- 8 г агарозы;
- 8 мл Трис-ацетатного-ЭДТА буфера;
- 80 мкл бромистого этидия.\*

\*Бромистый этидий в составе геля интеркалирует между азотистыми основаниями дуплекса и флюоресцирует в УФ-лучах.

При нанесении на гель исследуемые образцы окрашивали бромфеноловым синим – в соотношении 5:1 для визуализации хода ЭФ. В

качестве маркера использовался с диапазоном фрагментов от 100 до 1000 п.н. Напряжение тока в электрофорезной камере составляло 75V при проведении ЭФ. Вольтаж подбирался из расчёта 5V на 1 линейный сантиметр геля. Визуализация результатов ЭФ была сделана с помощью трансиллюминатора.

Картина ЭФ каждого образца должна иметь следующий вид:

- Одна полоса соответствующая длине интересующего нас ампликона
- Электрофореграмма не должна содержать полосы от 40 до 60 п.н., соответствующие димерам праймеров и зондов.
- Электрофореграмма не должна содержать полосы, соответствующие неспецифическим продуктам амплификации.

## **2.7 Валидация подобранных TaqMan систем для полимеразной цепной реакции в реальном времени**

После проверки праймеров методами рутинной ПЦР и ЭФ была проведена валидация подобранной TaqMan системы праймеры-зонд с использованием ПЦР в реальном времени и генов сравнения (генов «домашнего хозяйства», housekeeping genes) POLR2F и PSMA5.

Сначала мы готовим матричный раствор с кДНК(концентрация 54,4 нг/мкл), и затем делаем серию разбавлений, для каждого последующего разведения концентрация кДНК уменьшалась в 2 раза. В качестве кДНК-матрицы был использован образец таламуса человека, так как там достаточная представленность транскрипта для проведения валидации.

## **2.8 Статистический анализ данных**

### *Валидация*

По результатам валидации подобранных систем TaqMan был получен набор значений Ct для гена-кандидата и для гена «домашнего хозяйства» для

всех 10 концентраций образца. Далее была построена прямая в координатах  $\log[N]/dCt$  (логарифм от значения концентрации / разница средних значений  $Ct$  для гена-кандидата и гена «домашнего хозяйства»). В уравнении этой прямой, записанном в виде  $y=ax+b$ , значение  $(\pm a)$  показывает, за сколько циклов происходит увеличение сигнала флуоресценции на порядок. Значение  $(1/a)$  показывает, на сколько порядков изменится количество ДНК за один цикл реакции. Валидация считается успешной при условии  $|a| < 0,1$ .

Эффективность ПЦР – число показывающее, во сколько раз изменится количество фрагментов ДНК за один цикл. Эффективность ПЦР вычисляется по формуле:  $E=10^{1/a}$ .

#### *Биоинформатический анализ*

Расчет относительных уровней экспрессии проводился с использованием метода сравнения пороговых уровней амплификации  $\Delta\Delta Ct$  [30]. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ «StatisticaforWindows 8.0» (StatSoft, Inc., 2007), STATISTICA (dataanalysissoftwaresystem, version 8.0) и программного обеспечения MS Excel 2010 (Microsoft). Для оценки относительных уровней экспрессии генов применяли непараметрический U-тест Манна-Уитни [3,42], так как он используется для анализа малых выборок.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Отбор генов-кандидатов болезни Паркинсона

В ходе работы был проведен анализ литературы в результате которого были найдены гены(*NRF1*, *DNM2*, *WFS1*, *GABBR1*) для экспрессионного анализа, которые теоретически могли бы быть задействованы в патогенезе БП. функций данных генов которые пересекаются с патологическими процессами происходящими в ЦНС при БП отмечены в таблице 8.

Таблица 8 – Функции белков-кандидатов на роль в патогенезе БП

| Ген/белок                                                              | Предполагаемая функция                                                                                                                                                                               | литература           |
|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| <i>NRF1</i> /ядерный<br>Респираторный фактор 1                         | фактор транскрипции ключевых<br>метаболических генов, регулирующих<br>клеточный рост, дыхание, транскрипции и<br>репликации митохондриальной ДНК, биогенез<br>генов и других митохондриальных белков | [28,49,57,<br>63,86] |
| <i>DNM2</i> /Динамин 2                                                 | Участвует в отщеплении везикул при<br>эндоцитозе                                                                                                                                                     | [5]                  |
| <i>WFS1</i> /Вольфрамин                                                | регуляция уровня кальция в цитоплазме клеток<br>и возможное участие в экзоцитозе<br>нейромедиаторов                                                                                                  | [ 55,76]             |
| <i>GABBR1</i> /R1-субъединица<br>G-белок-связанного<br>ГАМКВ-рецептора | участвует как субъединица в составе ГАМК-<br>ергического рецептора в ГАМК-ергических<br>нейронах в прямом и непрямом пути.                                                                           | [81]                 |

### 3.2 Подбор и проверка TaqMan систем для полимеразной цепной реакции в реальном времени

В ходе данной работы был проведен подбор систем праймеры-зонд для

ПЦР в реальном времени (TaqMan) для выбранных генов-кандидатов. Так же была проверена специфичность данных систем на посторонние транскрипты и геном. Последовательности молекул РНК данных систем представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Последовательности ген-специфичных праймеров и зондов.

| Ген                           | Нуклеотидная последовательность                                                                                                                                             | Температура отжига, °C | Длина ампликона, bp |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------------|
| <i>POLR2F</i> *NM_021974.3    | Зонд: 5'-FAM-<br>CTTCATCCTCCTCCACATCATCAAAGTCGTCG-<br>BHQ1-3'<br>Прямой праймер: 5'-<br>ATGTCAGACAACGAGGACAATTTTG-3'<br>Обратный праймер: 5'-<br>TCTTCGGCATTCTCCAAGTCATC-3' | 65,0<br>55,6<br>56,0   | 125                 |
| <i>PSMA5</i> *NM_001199772.1  | Зонд: 5'-FAM-<br>AGCCATCAAGTCTTCACTCATCATCCTC-BHQ1-<br>3'<br>Прямой праймер: 5'-<br>AGAAGTTTACCACAAGTCTATGAC-3'<br>Обратный праймер: 5'-<br>CATTCAGCTTCTCCTCCATTAC-3'       | 61,7<br>55,3<br>56,2   | 130                 |
| <i>NRF1</i><br>NM_001293163.1 | Зонд: 5'-VIC-<br>CACGTTTGCTTCGGAAACTTCGAGCCACG-<br>BHQ-2-3'<br>Прямой праймер: 5'-<br>AGAAACGGAAACGGCCTCAT-3'<br>Обратный праймер: 5'-<br>CTTGCTGTCCCACACGAGTA-3'           | 70<br>59,9<br>59,6     | 123                 |

|                                    |                                                                                                                                                      |                      |     |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----|
| <i>DNM2</i><br>NM_001005.<br>360.2 | Зонд: 5'- VIC-TTGGAGAACAAGTTGCTCCC-<br>BHQ2-3'<br>Прямой праймер:5'-<br>TCACCAAGCTTGACCTGATG-3'<br>Обратный праймер:5'-<br>CGCCAATGTAGCCTCTTCTC-3'   | 58,5<br>57,8<br>58,4 | 90  |
| <i>WFS1</i><br>NM_006005.<br>3     | Зонд: 5'-VIC-<br>CCTGAGGACCTGCCACTGCGTCTGA-BHQ2-3'<br>Прямой праймер:5'-GACGAGCTGGCGGGGAA-3'<br>Обратный праймер:5'-<br>GGTACTCCTTGATCTCCATGATGGA-3' | 69,9<br>61,8<br>60,2 | 94  |
| <i>GABBR1</i><br>NM_021904.<br>2   | Зонд: 5'- VIC- ATTCCAGCCTCCTTCACTCGTT-<br>BHQ2-3'<br>Прямой праймер:5'-CTGGAAGAAGATTGCTAC-3'<br>Обратный праймер:5'-<br>CTGGATCTGAGAAGAAAC-3'        | 68,9<br>60,8<br>60,2 | 128 |

\*«Гены домашнего хозяйства»

### *Электрофорез в агарозном геле*

Для проверки праймеров проводилась обычная пцр, при этом температурный режим использовался тот же что и при ПЦР в реальном времени. После этого для визуализации продуктов амплификации проводился горизонтальный электрофорез в 2%-ом агарозном геле. Затем результаты ЭФ были засняты в УФ-трансиллюминаторе Biometra BioDocAnalaze (Германия). результаты ЭФ представлены на рис 3.

На электрофореграмме видно, что длины ампликонов соответствуют теоретически предполагаемым длинам, и нет неспецифических продуктов. Следовательно, данные праймеры могут быть использованы для ПЦР в реальном времени для соответствующих генов.



Рисунок 3. Горизонтальный ЭФ в агарозном геле. к1-к6: отрицательные контроли (цифрами 1-6 обозначены гены *POLR2F*, *PSMA5*, *NRF1*, *DNM2*, *WFS1*, *GABBR1* соответственно). Буквой М обозначен ДНК-маркер.

### Валидация

Валидация является простым и удобным методом для определения эффективности проведения реакции, а также для оценки правильности выбора зонда для системы праймер-зонд. Этот метод основан на параллельном проведении ПЦР в реальном времени с разной концентрацией кДНК. В данной работе было проведено десять разведений, при этом при каждом последующем разведении концентрация кДНК уменьшалась в два раза.

Валидация генов *NRF1*, *DNM2*, *WFS1*, *GABBR1* проводилась относительно референсных генов *POLR2F* и *PSMA5*.

Результаты ПЦР в реальном времени приведены в виде графиков накопления продукта реакции (рис. 4-7).

Расчет относительных уровней экспрессии (таблицы 10-13) для каждого разведения проводился с использованием метода сравнения пороговых уровней амплификации  $C_t$  [40]. Где в качестве порогового значения уровня амплификации референсного гена было взято среднее значение пороговых уровней амплификации для двух генов домашнего хозяйства (хаускипинги).

По средним значениям  $dC_t$  из каждой таблицы 5-8 были построены графики зависимости логарифма количества кДНК ( $N$ ) от усредненного  $dC_t$ .

(рис. 8-11). Полученные прямые описываются уравнением:

$$y = -ax + b, (1)$$

где  $y$  – среднее значение  $dCt$ ;  $x$  – пороговый цикл; коэффициент  $a$ , взятый с отрицательным знаком показывает, за сколько циклов происходит увеличение сигнала флуоресценции (количества кДНК) на порядок.

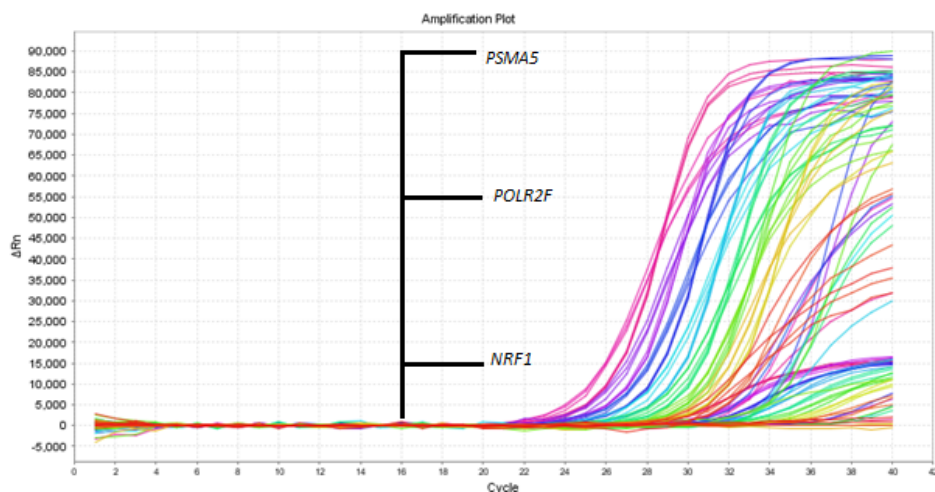


Рисунок 4. Валидация системы TaqMan для гена NRF1 на референсные гены POLR2F и PSMA5. по вертикали – сигнал флуоресценции, по горизонтали - номер цикла( $dCt$ )

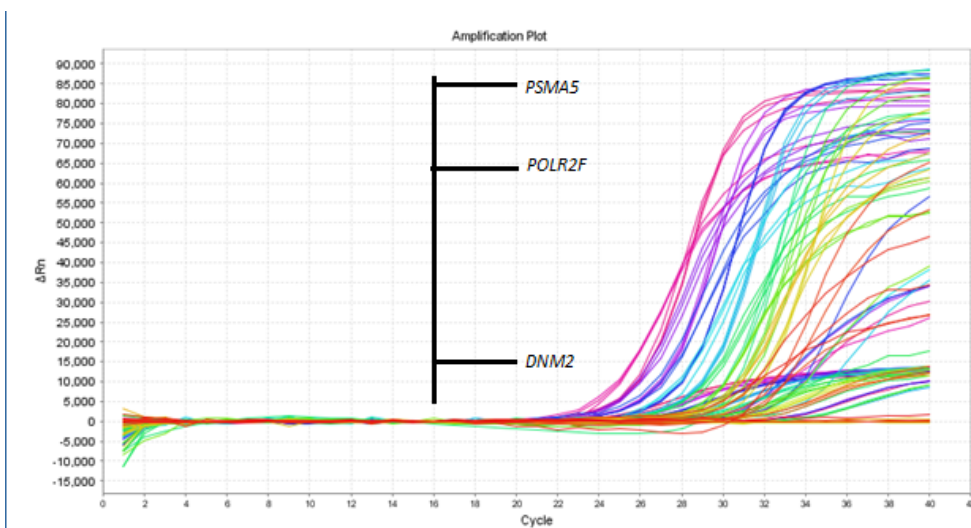


Рисунок 5. Валидация системы TaqMan для гена DNM2 на референсные гены POLR2F и PSMA5. по вертикали – сигнал флуоресценции, по горизонтали - номер цикла( $dCt$ )

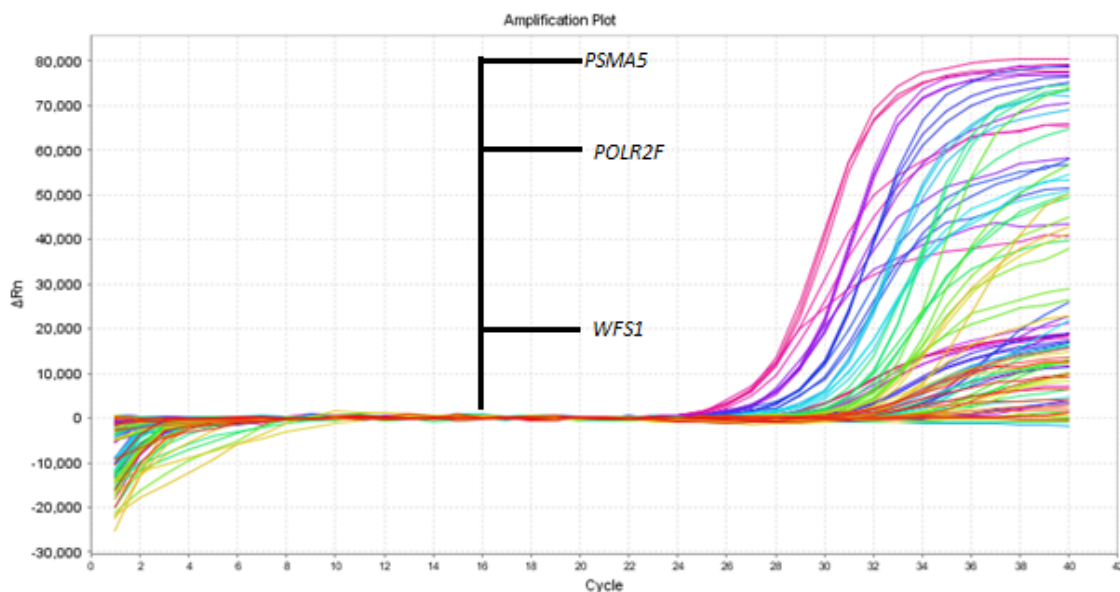


Рисунок 6. Валидация системы TaqMan для гена *WFS1* на референсные гены *POLR2F* и *PSMA5*. по вертикали – сигнал флуорисценции, по горизонтали - номер цикла(*dCt*)

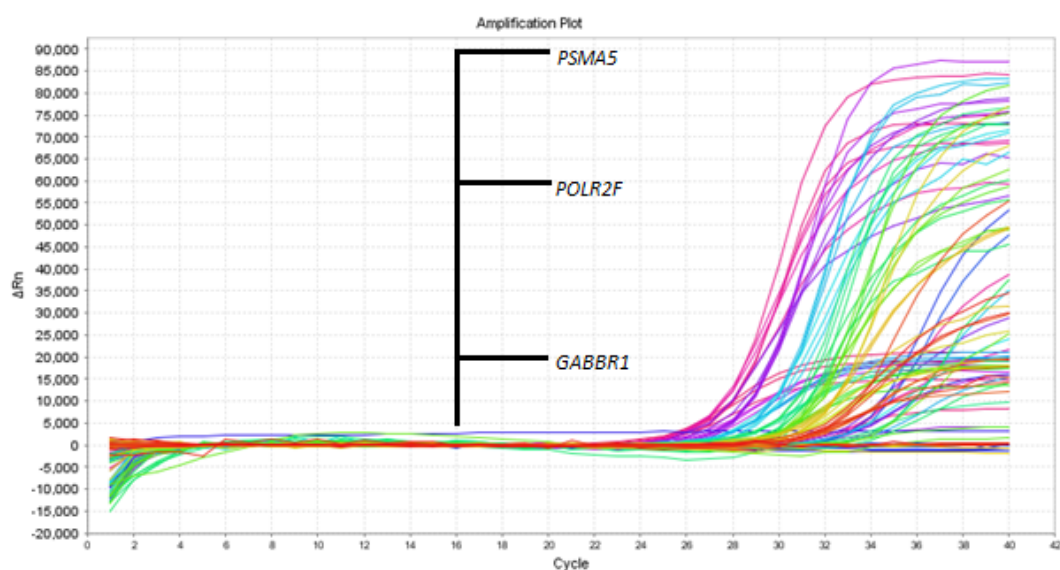


Рисунок 7. Валидация системы TaqMan для гена *GABBR1* на референсные гены *POLR2F* и *PSMA5*. по вертикали – сигнал флуорисценции, по горизонтали - номер цикла(*dCt*)

Числительные данные о пороговом цикле генов домашнего хозяйства и генов интереса представлены в таблицах 10-13.

Таблица 10 – Пороговые циклы *NRF1* и генов-хаускипингов (*POLR2F* и *PSMA5*) и стандартное отклонение

| Разведение | NRF1 <sup>1</sup> | XK <sup>2</sup> | dCt <sup>3</sup> | Mean dC (y) <sup>4</sup> | SD <sup>5</sup> |
|------------|-------------------|-----------------|------------------|--------------------------|-----------------|
| 1          | 38,90105          | 33,731207       | 4,583504         | 4,302041063              | 0,536346        |
|            | 38,95661          | 33,971485       | 4,639065         |                          |                 |
|            | 38,9335           | 35,249947       | 3,683553         |                          |                 |
| 2          | 37,10012          | 32,872758       | 4,133626         | 4,631532987              | 0,446025        |
|            | 37,73294          | 32,965988       | 4,766446         |                          |                 |
|            | 37,96102          | 33,060738       | 4,994527         |                          |                 |
| 3          | 36,13022          | 31,871999       | 4,119668         | 4,537480672              | 0,407836        |
|            | 36,56878          | 31,91434        | 4,558225         |                          |                 |
|            | 36,9451           | 32,245323       | 4,934549         |                          |                 |
| 4          | 33,91202          | 30,506348       | 3,231356         | 3,565737406              | 0,472886        |
|            | 34,58078          | 30,569478       | 3,900119         |                          |                 |
|            | 35,35441          | 30,96617        | 4,673743         |                          |                 |
| 5          | 33,59468          | 29,775277       | 3,645337         | 3,921132406              | 0,243117        |
|            | 33,963            | 29,796987       | 4,013658         |                          |                 |
|            | 34,05375          | 30,275766       | 4,104402         |                          |                 |
| 6          | 32,57393          | 28,855496       | 3,590312         | 3,943223953              | 0,383025        |
|            | 32,87244          | 28,988525       | 3,888816         |                          |                 |
|            | 33,33416          | 29,106839       | 4,350543         |                          |                 |
| 7          | 31,48808          | 27,633033       | 3,681493         | 3,782668749              | 0,089505        |
|            | 31,62157          | 27,821819       | 3,814987         |                          |                 |
|            | 31,65811          | 27,964893       | 3,851526         |                          |                 |
| 8          | 30,37982          | 26,478165       | 3,740767         | 3,802180926              | 0,087164        |
|            | 30,40288          | 26,685714       | 3,763831         |                          |                 |
|            | 30,54099          | 26,753273       | 3,901944         |                          |                 |
| 9          | 29,44566          | 25,641075       | 3,728607         | 3,862309774              | 0,123056        |
|            | 29,60455          | 25,698805       | 3,887501         |                          |                 |
|            | 29,68787          | 25,811277       | 3,970821         |                          |                 |
| 10         | 28,54784          | 24,542698       | 3,946921         | 4,113241514              | 0,15317         |
|            | 28,74522          | 24,611871       | 4,144303         |                          |                 |
|            | 28,84942          | 24,648193       | 4,2485           |                          |                 |

1 – пороговый цикл NRF1; 2 – среднее значение пороговых циклов хаускипингов; 3 – разница между пороговыми циклами NRF1 и хаускипингами; 4 – усредненное значение dCt; 5 - стандартное отклонение

Таблица 11 – Пороговые циклы DNM2 и генов-хаускипингов(POLR2F и PSMA5) и стандартное отклонение

| разведение | DNM2 <sup>1</sup> | ХК <sup>2</sup> | dCt <sup>3</sup> | Mean dC (y) <sup>4</sup> | SD <sup>5</sup> |
|------------|-------------------|-----------------|------------------|--------------------------|-----------------|
| 1          | 35,07668          | 24,216183       | 2,28733          | 2,916045666              | 0,107249        |
|            | 35,62956          | 33,504003       | 2,840209         |                          |                 |
|            | 35,78123          | 32,074703       | 2,991882         |                          |                 |
| 2          | 33,49209          | 31,125196       | 1,696911         | 1,999685287              | 0,32098         |
|            | 33,76112          | 31,674698       | 1,965939         |                          |                 |
|            | 34,13139          | 32,585648       | 2,336205         |                          |                 |
| 3          | 31,70642          | 31,577301       | -0,55662         | -0,14779409              | 0,436124        |
|            | 32,065            | 31,882891       | -0,19804         |                          |                 |
|            | 32,57432          | 33,32893        | 0,311277         |                          |                 |
| 4          | 31,11876          | 30,194205       | 0,182825         | 1,409382184              | 0,131787        |
|            | 32,25213          | 30,901318       | 1,316195         |                          |                 |
|            | 32,43851          | 31,71229        | 1,50257          |                          |                 |
| 5          | 30,49068          | 29,295651       | 0,932908         | 1,625611305              | 0,153183        |
|            | 31,07507          | 29,819894       | 1,517295         |                          |                 |
|            | 31,2917           | 30,363013       | 1,733928         |                          |                 |
| 6          | 29,3606           | 28,749308       | 0,070663         | 0,14450264               | 0,104424        |
|            | 29,50828          | 29,134688       | 0,218342         |                          |                 |
|            | 30,28017          | 29,445184       | 0,990232         |                          |                 |
| 7          | 28,18768          | 27,167528       | 0,809218         | 1,184844653              | 0,325305        |
|            | 28,74975          | 27,389229       | 1,371297         |                          |                 |
|            | 28,75248          | 27,578614       | 1,374019         |                          |                 |
| 8          | 27,2561           | 26,14241        | 1,001657         | 1,32945474               | 0,317862        |
|            | 27,6048           | 26,258615       | 1,350357         |                          |                 |
|            | 27,89079          | 26,362302       | 1,63635          |                          |                 |
| 9          | 26,48796          | 25,439811       | 0,970589         | 1,199767431              | 0,379195        |
|            | 26,50862          | 25,461789       | 0,991252         |                          |                 |
|            | 27,15483          | 25,650515       | 1,637461         |                          |                 |
| 10         | 25,48468          | 24,326213       | 1,052527         | 1,147262891              | 0,106381        |
|            | 25,55907          | 24,465583       | 1,126913         |                          |                 |
|            | 25,6945           | 24,504664       | 1,262348         |                          |                 |

1 – пороговый цикл DNM2; 2 – среднее значение пороговых циклов хаускипингов; 3 – разница между пороговыми циклами DNM2и хаускипингами; 4 – усредненное значение dCt; 5 - стандартное отклонение

Таблица 12 – Пороговые циклы WFS1 и генов-хаускипингов (POLR2F и PSMA5) и стандартное отклонение

| Разведение | WFS1 <sup>1</sup> | ХК <sup>2</sup> | dCt <sup>3</sup> | Mean dC (y) <sup>4</sup> | SD <sup>5</sup> |
|------------|-------------------|-----------------|------------------|--------------------------|-----------------|
| 1          | 34,02786          | 33,282217       | 0,446836         | 0,654308001              | 0,17968         |
|            | 34,33787          | 33,879837       | 0,756841         |                          |                 |
|            | 34,34027          | 33,06691        | 0,759248         |                          |                 |
| 2          | 32,90501          | 32,26278        | 0,596638         | 0,725690524              | 0,11799         |
|            | 33,06076          | 32,283679       | 0,752392         |                          |                 |
|            | 33,13641          | 32,378657       | 0,828041         |                          |                 |
| 3          | 30,90938          | 30,832457       | -0,16049         | -0,07005692              | 0,12789         |
|            | 31,09024          | 31,307278       | 0,020375         |                          |                 |
|            | 32,11767          | 31,871045       | 1,047801         |                          |                 |
| 4          | 30,22073          | 30,130153       | -0,07653         | 0,80224673               | 0,262612        |
|            | 30,91382          | 30,237292       | 0,616552         |                          |                 |
|            | 31,28521          | 30,524348       | 0,987941         |                          |                 |
| 5          | 29,54065          | 29,456409       | -0,12025         | 0,182630857              | 0,441038        |
|            | 29,64041          | 29,663396       | -0,02049         |                          |                 |
|            | 30,34953          | 29,862898       | 0,68863          |                          |                 |
| 6          | 28,0724           | 28,722285       | -0,65776         | -0,21411228              | 0,387192        |
|            | 28,68991          | 28,738029       | -0,04025         |                          |                 |
|            | 28,78583          | 29,271566       | 0,055671         |                          |                 |
| 7          | 27,24627          | 27,407409       | -0,32314         | -0,09309228              | 0,251939        |
|            | 27,43712          | 27,443643       | -0,13229         |                          |                 |
|            | 27,74556          | 27,857177       | 0,176147         |                          |                 |
| 8          | 26,19648          | 26,352052       | -0,32673         | -0,24444803              | 0,086397        |
|            | 26,27106          | 26,541193       | -0,25215         |                          |                 |
|            | 26,36875          | 26,676384       | -0,15446         |                          |                 |
| 9          | 24,93058          | 25,438241       | -0,61683         | 0,116529147              | 0,250319        |
|            | 25,48693          | 25,574995       | -0,06047         |                          |                 |
|            | 25,84094          | 25,628981       | 0,293531         |                          |                 |
| 10         | 24,22714          | 24,374263       | -0,26161         | 0,076377551              | 0,375542        |
|            | 24,49884          | 24,464226       | 0,010095         |                          |                 |
|            | 24,9694           | 24,627758       | 0,480648         |                          |                 |

1 – пороговый цикл WFS1; 2 – среднее значение пороговых циклов хаускипингов; 3 – разница между пороговыми циклами WFS1 и хаускипингами; 4 – усредненное значение dCt; 5 - стандартное отклонение.

Таблица 13 – Пороговые циклы GABBR1 и генов-хаускипингов (POLR2F и PSMA5) и стандартное отклонение

| Разведение | GABBR1 <sup>1</sup> | XK <sup>2</sup> | dCt <sup>3</sup> | Mean dC (y) <sup>4</sup> | SD <sup>5</sup> |
|------------|---------------------|-----------------|------------------|--------------------------|-----------------|
| 1          | 36,66731            | 33,034756       | 3,088095         | 3,240513484              | 0,229336        |
|            | 36,7084             | 33,521864       | 3,129183         |                          |                 |
|            | 37,08348            | 33,636564       | 3,504263         |                          |                 |
| 2          | 35,35303            | 31,931068       | 2,932509         | 3,252269745              | 0,481589        |
|            | 35,43866            | 32,502397       | 3,018141         |                          |                 |
|            | 36,22668            | 32,82809        | 3,806159         |                          |                 |
| 3          | 34,06628            | 30,569078       | 3,015588         | 4,032114983              | 0,290135        |
|            | 34,87765            | 30,947268       | 3,826959         |                          |                 |
|            | 35,28796            | 31,154109       | 4,237271         |                          |                 |
| 4          | 32,99581            | 30,188521       | 2,673206         | 2,830669403              | 0,222686        |
|            | 33,31074            | 30,288342       | 2,988132         |                          |                 |
|            | 34,06646            | 30,490952       | 3,743855         |                          |                 |
| 5          | 31,68339            | 29,210073       | 2,24491          | 3,596163432              | 0,458943        |
|            | 32,71012            | 29,364346       | 3,271641         |                          |                 |
|            | 33,35916            | 29,74101        | 3,920685         |                          |                 |
| 6          | 31,52586            | 28,25643        | 3,123851         | 3,245001793              | 0,141827        |
|            | 31,61216            | 28,440816       | 3,210149         |                          |                 |
|            | 31,80302            | 28,508793       | 3,401006         |                          |                 |
| 7          | 29,82963            | 27,30693        | 2,337986         | 2,580820719              | 0,245659        |
|            | 30,06691            | 27,516605       | 2,575266         |                          |                 |
|            | 30,32086            | 27,651402       | 2,82921          |                          |                 |
| 8          | 29,64203            | 26,294786       | 3,212702         | 3,303379377              | 0,097112        |
|            | 29,72091            | 26,458253       | 3,291586         |                          |                 |
|            | 29,83517            | 26,534935       | 3,40585          |                          |                 |
| 9          | 28,30626            | 25,202685       | 2,951487         | 3,001034737              | 0,070072        |
|            | 28,40535            | 25,300095       | 3,050583         |                          |                 |
|            | 29,40993            | 25,561526       | 4,055162         |                          |                 |
| 10         | 27,36053            | 24,061955       | 3,11364          | 3,32872359               | 0,209292        |
|            | 27,58773            | 24,258873       | 3,340833         |                          |                 |
|            | 27,77859            | 24,419857       | 3,531698         |                          |                 |

1 – пороговый цикл GABBR1; 2 – среднее значение пороговых циклов хаускипингов; 3 – разница между пороговыми циклами GABBR1и хаускипингами; 4 – усредненное значение dCt; 5 - стандартное отклонение

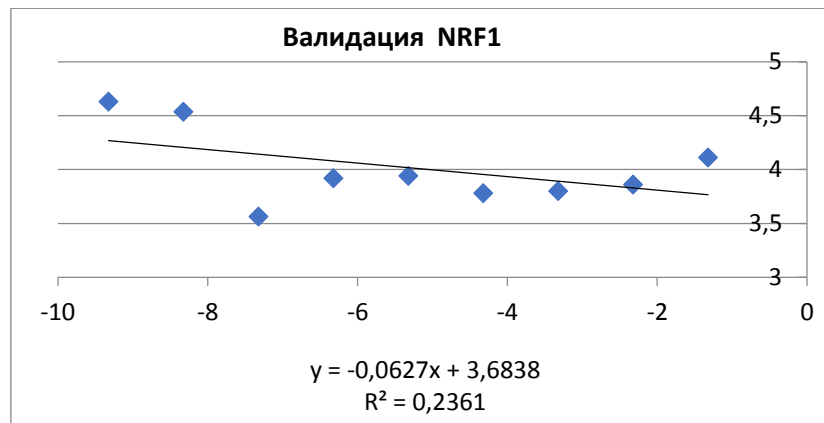


Рисунок 8. График Зависимости  $\ln(N)/dCt$  для гена *NRF1* и хаускипингов

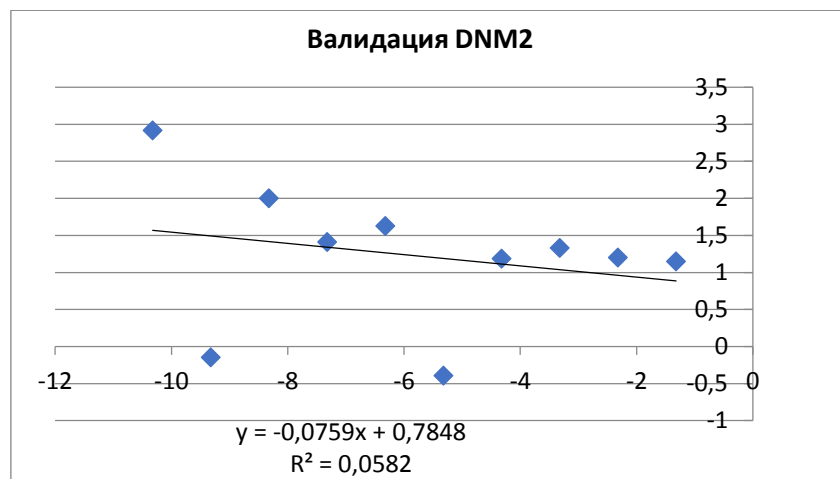


Рисунок 9. График Зависимости  $\ln(N)/dCt$  для гена *DNM2* и хаускипингов

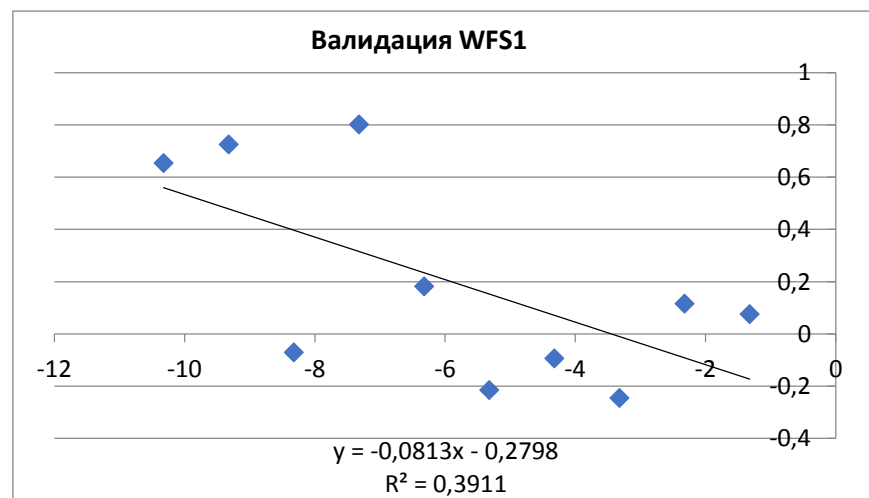


Рисунок 10. График Зависимости  $\ln(N)/dCt$  для гена *WFS1* и хаускипингов

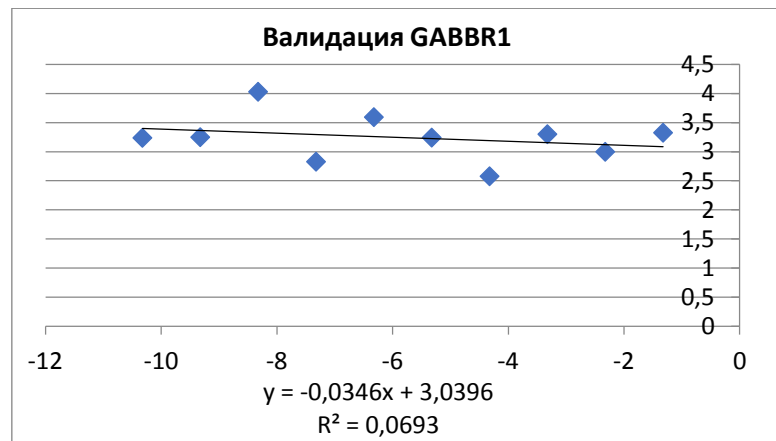


Рисунок 11. График Зависимости  $\ln(N)/dCt$  для гена GABBR1 и хаускипингов

Как видно из функций графиков 1-4, коэффициента из уравнений (1) меньше 0.1 по модулю, что удовлетворяет поставленным требованиям для успешной валидации гена. По этому нормировки на абсолютное количество кДНК не требуется.

### 3.3 Анализ изменения уровней мРНК генов-кандидатов в периферической крови пациентов с болезнью Паркинсона, находящихся на ранних стадиях заболевания

На данный момент проведено не малое количество работ по изучению транскриптома на постмортальном материале пациентов с БП у людей находящихся на последних стадиях данного заболевания по Хен и Яру. На данных этапах продолжительное систематическое введение препаратов и болезни сопутствующие БП могут привносить существенное изменение в результаты исследований. Поэтому наиболее информативными в плане получения картины механизмов возникновения БП и патологических изменений на ранних стадиях БП будут выступать исследования транскриптома у лиц находящихся на ранних клинических стадиях развития болезни.

В данной работе для изменения мРНК исследуемых генов у пациентов с БП были взяты только пациенты с идиопатической формой БП, у которых не было выявлено мутаций семейных форм БП, то есть причина развития болезни у данных индивидуумов неизвестна.

Все пациенты с БП в находились на ранних стадиях развития БП (1-2 по шкале Хен и Яра)

В качестве групп сравнения были отобраны 2 выборки: неврологически здоровые лица и группа неврологического контроля, в которую входили лица с различными неврологическими заболеваниями ЦНС, патогенез которых максимально отличается от патогенеза БП(боковой амиотрофический склероз, болезнь Шарко-Мари-Тута, болезнь Вильсона-Коновалова, мозжечковая атаксия и др.

Результаты экспрессионного анализа генов *NRF1*, *DNM2*, *WFS1*, *GABBR1*, которые были проделаны в рамках этой работы представлены в таблице 9.

Таблица 14 – Изменение уровней мРНК генов-кандидатов при БП

| Гены          | БП леченные            | БП не леченные | Н.к.      |
|---------------|------------------------|----------------|-----------|
| <i>NRF1</i>   | 0,81 <sup>1</sup>      | 0,89           | 1,14      |
|               | 0,51-0,99 <sup>2</sup> | 0,64-1,31      | 0,65-1,34 |
| <i>DNM2</i>   | <b>0,29</b>            | 0,89           | 0,81      |
|               | <b>0,26-0,58</b>       | 0,48-1,29      | 0,39-1,18 |
| <i>WFS1</i>   | 0,48                   | 0,89           | 1,07      |
|               | 0,38-0,88              | 0,42-2,10      | 0,44-2,19 |
| <i>GABBR1</i> | 1,03                   | 1,13           | 1,19      |
|               | 0,27-1,90              | 0,61-1,87      | 0,76-2,78 |

<sup>1</sup> медиана, <sup>2</sup> 25-75% процентиля. Значения с  $p < 0,05$  выделены цветом и жирным шрифтом. Уровень экспрессии в контроле принят за единицу. Н.к – неврологический контроль.

Как видно из таблицы 14, в ходе работы было выявлено достоверно значимое изменение для гена *DNM2* у группы с БП принимавшим медикаментозное лечение.

Ген DNM2 кодирует белок Динамин 2 который представляет собой эукариотическую клеточную ГТФазу, участвующую в эндоцитозе. Все G-белки и в том числе динамин имеют значительное сходство последовательности на N-концевой части молекулы, которая содержит домен ГТФазу. Динамин вовлечен в такие процессы в клетке как формирование эндоцитозных везикул.

Динамин играет огромную роль в процессе отделения сформировавшейся везикулы от цитоплазматической мембраны или другой мембранной органеллы клетки, ее доставки к месту назначения и слияния с другой мембранной структурой.

Во время образования везикулы, динамин образует спиральные комплексы на поверхности мембраны вокруг везикулярных впячиваний мембраны. При гидролизе ГТФ спиральные комплексы начинают сокращаться и тем самым способствуют отрыву образованной везикулы от мембраны (рис. 12).

Для того, чтобы понять возможную роль динамина в патологическом процессе при БП, нужно рассмотреть механизм обратного захвата дофамина в пресинаптическое окончание.

После экзоцитоза нейромедиатора в синаптическую щель, часть дофамина присоединяется к дофаминовым рецепторам постсинаптического образования и индуцируют потенциал действия в воспринимающем нейроне. Часть дофамина после экзоцитоза оказывается в синаптической щели. Эта часть молекул будет подвержена механизму обратного захвата. Обратный захват начинается с моноаминовых транспортеров – для дофамина это белок DAT (dopamine active transporter) кодируемый геном SLC6A3. Затем попавший в цитозоль пресинаптического образования дофамин начинает подвергаться двум процессам:

- 1) деградация дофамина под действием моноаминоксидазы локализованной на митохондриях с дальнейшей деградацией до получения конечного продукта гомованилиновой кислоты.

- 2) переносу дофамина в везикулы под действием везикулярных моноаминовых транспортеров (VMAT1 и VMAT2) кодируемые генами

*SLC18A1* и *SLC18A2* соответственно, которые представляют собой транспортеры закачивающие моноаминовые нейротрансмитеры такие как дофамин, гистамин, серотонин и норадреналин из цитоплазмы в вновь образованные везикулы [16,31]. Затем образованные в ходе везикулярного захвата везикулы с нейротрансмиттером могут быть опять использованы для передачи нейроном импульса в постсинаптическое образование.

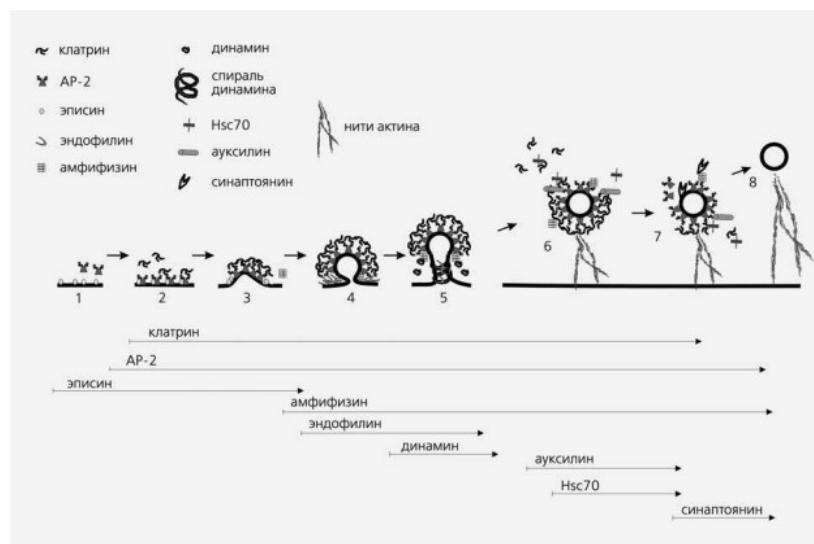


Рисунок 12. Этапы и механизм клатрин-опосредованного эндоцитоза. Сначала на мембрану высаживаются молекулы эпсина (1), которые облегчают последующее присоединение к этому участку адапторных комплексов AP-2 (2), а также белков AP-180, Eps15 (не показаны). Образовавшийся белковый ансамбль привлекает трискелии клатрина (2) и стимулирует их полимеризацию в решетку (3). Одновременно под влиянием эпсина (3), а затем эндофилина и амфифизина (4) везикулярная мембрана искривляется, что ведет к формированию глубоких ямок с клатриновым покрытием (4). При участии амфифизина белок динамин полимеризуется и образует узкий спиральный воротник (5), сдавливающий перешеек между ямкой и остальной мембраной. При затягивании воротника везикула отделяется (6), и покрытие послойно удаляется: клатриновая решетка (6) — шапероном Hsc70, а адапторные белки (7) — фосфатазой синаптозинном, которая привлекается к везикуле амфифизином. Направленная полимеризация актина способствует перемещению везикулы (8)[5].

Необходимо отметить, что на клинических стадиях БП наблюдается сильное падение уровня дофамина в стриатуме, а также снижение количества ДА-нейронов, как уже упоминалось выше. Этот факт был неоднократно доказан как при исследовании пациентов с БП, так и при исследовании модельных объектов. При медикаментозной терапии происходит стимуляция выработки дофамина оставшимися ДА-нейронами для компенсации недостатка дофамина в стриатуме. Так, снижение экспрессии DNM2 может приводить к снижению интенсивности эндоцитоза. Это, в свою очередь, ведет к тому, что дофамин дольше находится в синаптической щели и способствует более интенсивной стимуляции постсинаптической мембраны и соответственно, передаче нервного импульса у пациентов с БП, подвергавшихся лечению. Однако необходимо отметить что данная гипотеза нуждается в более детальной проверке.

Вольфрамин – трансмембранный ион-селективный белок который локализуется на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и регулирует концентрацию кальция в клетке путем нагнетания ионов кальция из цитоплазмы внутрь цистерн ЭПР [12,55,76].

Мутации данного гена ведут к нарушению клеточного гомеостаза кальция что приведет к нарушению в работе в ряде клеточных систем, включая работу синаптической передачи в нейронах и многих других процессах в которые вовлечен ион кальция.

Рассмотрим возможную связь между нарушением в процессе синаптической передачи в которую вовлечен белок вольфрамин и патогенезом БП. Для этого рассмотрим работу молекулярной машины SNARE.

SNARE – это большой белковый комплекс, осуществляющий слияние внутриклеточных везикул с мембраной (экзоцитоз) или, например слияние двух мембранных органоидов клетки (см рис. 13) [47].

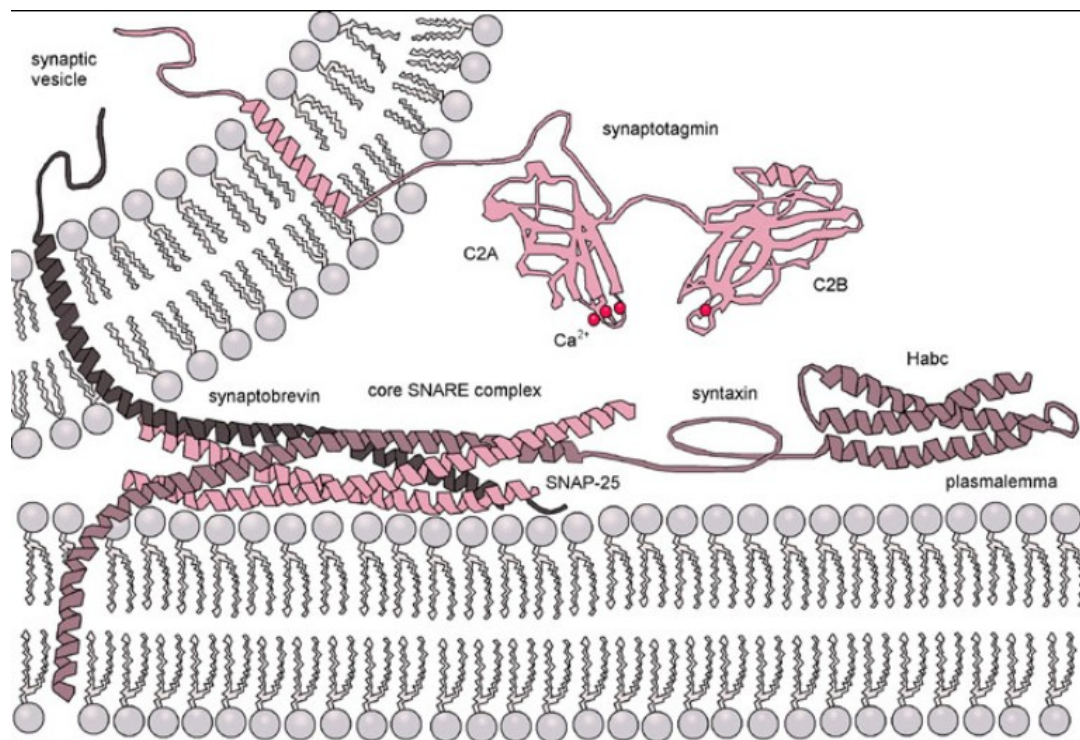


*Рисунок 13. Молекулярная машина экзоцитозного высвобождения нейромедиатора в синапс. SNARE комплекс формируется за счёт образования четырёхспиральной цепки между синаптобревином, синтаксином и SNAP-25. Синаптотагмин служит кальциевым сенсором и внутренним регулятором комплексообразования[47].*

Одна из субъединиц этого белкового комплекса, а именно Синаптотагмин, служит кальциевым сенсором, который воспринимает ионы кальция как сигнал для комплексообразования и активации структуры SNARE, что приводит к экзоцитозу нейромедиаторных везикул. Во время проведения импульса по нейрону, сначала происходит деполяризация мембраны за счёт нагнетания ионов натрия в клетку, потом открываются кальциевые каналы локализованные в пресинаптической мембране, запуская в цитоплазму ионы кальция которые связывают такие процессы как деполяризация мембраны и высвобождение нейромедиатора через активность комплекса SNARE [47].

Возможно поток кальция из ЭПР выпускаемый через ион-селективный трансмембранный белок вольфрамин может выступать в качестве

дополнительного фактора высвобождения нейромедиаторных везикул, действуя через механизм активации комплекса SNARE.

На исследуемых стадиях не было выявлено изменения в экспрессии данного гена. Возможно, данный ген изменяет свою экспрессию на более ранних или более поздних этапах развития данного заболевания.

Ядерный респираторный фактор 1 - это ДНК связывающий белок действующий как активатор транскрипции [28]. сайт связывания для ядерного респираторного фактора 1 обнаружен в промоторных частях генов кодирующих некоторые ключевые метаболические гены регулирующих :клеточный рост, дыхание, транскрипцию и репликацию митохондриальной ДНК. Так же ядерный респираторный фактор 1 регулируют транскрипцию генов, кодирующих ферменты биосинтеза гема, рибосомных белков митохондрий, и некоторые другие компоненты системы синтеза и транспорта белков митохондрий [63].

Ядерные респираторные факторы синтезируются в клетке на постоянном уровне. Повлиять на смещение этого уровня могут такие коактиваторы как факторы семейства PGC [28]. Белки этого семейства способны связываться с респираторными факторами тем самым усиливая их способность связываться с промоторными частями вышеперечисленных генов [49]. данный вид регуляции активности ядерных респираторных факторов может управлять суточными ритмами метаболических процессов, в частности ритмом дыхательной активности митохондрии.

Тут же стоит сказать об антагонисте белков семейства PGC. Белок RIP140, который является репрессором ядерного респираторного фактора 1. В некоторых тканях этот белок имеет принципиальное значение, например в клетках белых мышечных волокон, в которых не так сильно задействован и развит аэробный путь ресинтеза АТФ, или же в клетках белой жировой ткани, где происходит аккумуляция триглицеридов, за счет подавления активности митохондрий в клетке, которые бы просто эти запасы израсходовали.

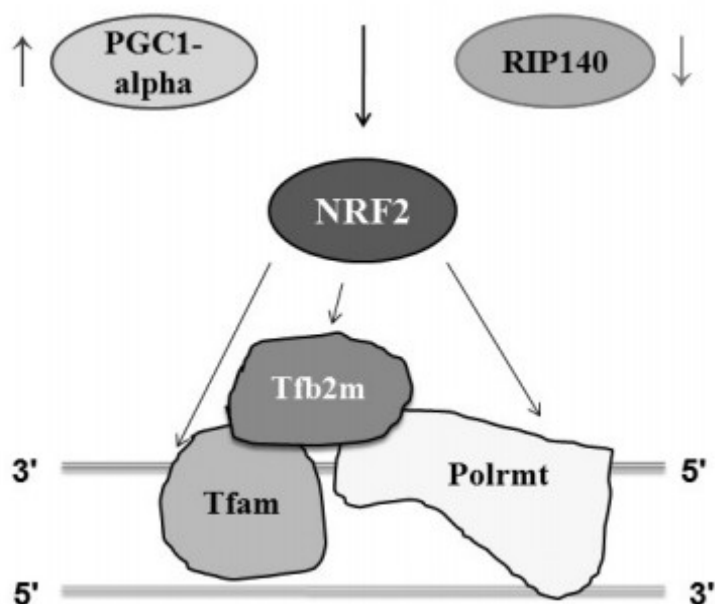


Рисунок 14. Механизм регуляции транскрипции мтДНК, участвующие в транскрипции мтДНК и регуляции этого процесса. Polrmt – митохондриальная ДНК-зависимая РНК-полимераза. Tfam, Tfb2m – факторы инициации транскрипции мтДНК. NRF2 – ядерный респираторный фактор. PGC-1 $\alpha$  – ядерный коактиватор факторов биогенеза митохондрий. RIP140 – ядерный корепрессор факторов биогенеза митохондрий [4].

За счет изменения соотношения этих факторов может поддерживаться дыхательная активность каждой клетки, и дисбаланс в данной системе может привести к нарушениям в работе митохондрий и в конечном итоге к митохондриальной дисфункции клетки [4], что является одной из основных причин патологического процесса приводящим к гибели нейронов при БП.

На важность гена *NRF1* при нейродегенеративных расстройствах могут указывать следующие данные.

На культивированных дофаминергических нейронах из эмбрионального среднего мозга крысы, которые экспрессировали мутантную форму  $\alpha$ -синуклеина. Чрезмерная экспрессия PGC-1 $\alpha$  в этих нейронах приводила к защите нейронов от повреждений, индуцированного мутантным  $\alpha$ -синуклеином. каким образом оверэкспрессия белка PGC-1 $\alpha$  приводит к

протекции нейронов пораженных  $\alpha$ -синуклеином. пока исследователи затрудняются ответить. но тот факт что *PGC* является кофактором белка ядерного респираторного фактора 1 и 2 может указывать на возможную роль активности гена ядерных респираторных факторов в формировании устойчивости нервных клеток оксидативному стрессу и роли в патогенезе БП.

Активность ядерного респираторного фактора 1 повышает синтетическую активность митохондрий и их деление. И как видно из результатов исследования, уровень экспрессии данного гена не изменился. О роли данного гена в патогенезе БП могут сказать дальнейшие исследования изменения экспрессии гена на более ранних или более поздних стадиях развития БП.

*GABBR1* – это ген кодирующий одну из двух субъединиц метаботропного рецептора ГАМК<sub>B</sub> [13,81]. ГАМК (Гамма-аминомасляная кислота) является основным ингибирующим нейромедиатором ЦНС млекопитающих. ГАМК действует на такие ионотропные рецепторы как ГАМК<sub>A</sub> и ГАМК<sub>C</sub>, чтобы вызвать быстрое синаптическое ингибирование, а так же на вышеупомянутый метаботропный рецептор ГАМК<sub>B</sub>, который используется для более длительного ингибирующего сигнала. Рецептор ГАМК<sub>B</sub> состоит из двух субъединиц R1 и R2 кодируемые соответственно генами *GABBR1* и *GABBR2*.

В данной работе был описан механизм регуляции двигательных программ с участием таких нейрональных кругов как прямой и непрямой путь в которых в качестве звеньев выступали и ГАМК-ергические нейроны. поэтому было решено проверить возможное участие ГАМК-ергических рецепторов на проявление моторных симптомов у пациентов с БП.

В ходе данного исследования не было установлено статически значимых данных об изменении экспрессии данного гена, поэтому информация о роли данного гена в патогенезе БП нуждаются в дальнейшей проверке и дополнении.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БП на сегодняшний день является одним из самых распространённых заболеваний НС, патогенез которой связан с нарушением в разных нейромедиаторных системах, с преобладанием нарушений в дофаминергической системе. Все это приводит к появлению симптомам характерным для БП и к дезорганизации НС в целом.

До сих пор осуществляется поиск молекулярно-генетических факторов, вовлеченных в патогенез данной болезни. Так же до сих пор осуществляется поиск механизмов и факторов, вовлеченных в инициирование развития данной болезни. Наряду с механизмами нейродегенерации нейронов при данной болезни, так же изучаются компенсаторные механизмы, которые осуществляют различные системы клетки, все эти данные позволяют собрать более полную картину о молекулярных процессах, происходящих в нервной системе у пациента подверженным БП.

В результате обзора литературы были отобраны гены *NRF1*, *DNM2*, *WFS1*, *GABBR*, которые предположительно могут быть задействованы в патологических процессах, происходящих при БП. Данные гены участвуют в таких процессах как митохондриальный биогенез, экзо- и эндоцитоз, синаптическая передача сигнала. Таким образом, изменение экспрессии этих генов может влиять на развитие БП.

Для подтверждения возможной роли данных генов в БП был проведен анализ изменения их экспрессии в периферической крови пациентов с БП, находящихся на ранних стадиях данной патологии (1-2 стадия по шкале Хен и Яра). Для этого были подобраны и провалидированы системы праймеров и зонды TaqMan для генов-кандидатов.

Было показано статистически значимое и специфическое для БП снижение относительных уровней мРНК гена *DNM2* почти в 3,5 раза у пациентов с БП, подвергавшихся лечению. Снижение экспрессии *DNM2* может приводить к снижению интенсивности эндоцитоза, в том числе, в

мозге. Это, в свою очередь, ведет к тому, что дофамин дольше находится в синаптической щели и способствует более интенсивной передаче нервного импульса у пациентов с БП, подвергавшихся лечению.

Таким образом, полученные данные дополняют общую картину молекулярно-генетических изменений, которые происходят в организме пациента с БП.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахметжанов В.К., Шашкин Ч.С., Керимбаев Т.Т. Болезнь Паркинсона. критерии диагностики. дифференциальная диагностика (обзор) // нейрохирургия и неврология Казахстана. 2016. С. 18-25.
2. Когданов Р.Р. Современное состояние проблемы этиопатогенеза болезни паркинсона и возможности ранней диагностики // Альманах клинической медицины. 2006. С. 147-155
3. Гланц, С. Медико-биологическая статистика. Москва: высш. образование, 1998. 459с.
4. Губина Н.Е., Евдокимовский Э.В. Ушакова Т.Е. Ядерная регуляция биогенеза митохондриальной ДНК в клетках печени при рентгеновском облучении мышей // Биофизика. 2012. С. 566-582
5. Зефирова А.Л. Эндоцитоз в нервной системе // Природа. 2009. С. 12-20
6. Иллариошкин С.Н. Этиология болезни Паркинсона: новые представления и новые вызовы // Болезнь Паркинсона и расстройства движений. Руководство для врачей по материалам III Национального конгресса по болезни Паркинсона и расстройствам движений (с международным участием). Под редакцией С.Н. Иллариошкина, О.С. Левина. 2014. С. 5-13.
7. Иллариошкин С.Н., Загоровская Т.Б., Маркова Е.Д. Генетические аспекты болезни Паркинсона // Неврол. журн. 2002. С. 47-52.
8. Левин О.С. Эпидемиология паркинсонизма и болезни Паркинсона // Неврол. журн. 2005. С. 41-49
9. Раздорская В.В., Воскресенская О.Н., Юдина Г.К. Болезнь Паркинсона в России: распространенность и заболеваемость (обзор) // Саратовский научно-медицинский журнал. 2016. С. 379–384.
10. Страчунская Е.Я. Паркинсонизм с позиций современных информационных концепций медицины. Смоленск, 2008. 208 с.

11. Aras S. MNRR1 (formerly CHCHD2) is a bi-organellar regulator of mitochondrial metabolism // *Mitochondrion*. 2015. P. 43-51.
12. Bansal V, Boehm BO, Darvasi A. Identification of a missense variant in the WFS1 gene that causes a mild form of Wolfram syndrome and is associated with risk for type 2 diabetes in Ashkenazi Jewish individuals // *Diabetologia*. 2018. P. 2180-2188.
13. Barati MT, Scherzer J, Klein JB. Cytoskeletal rearrangement and Src and PI-3K-dependent Akt activation control GABA(B)R-mediated chemotaxis // *Cell Signal*. 2015. P. 1178–1185.
14. Barbanti P. Increased expression of dopamine receptors on lymphocytes in Parkinson's disease // *Mov Disord*. 1999. P. 764-771.
15. Beilina A. Genes associated with Parkinson's disease: regulation of autophagy and beyond // *J Neurochem*. 2016. P. 91-107.
16. Bernstein A.I., Stout K.A., Miller G.W. *Vps35 in cooperation with LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis through the endosomal pathway in Drosophila* // *Neurochem. Int*. 2014. P. 89–97.
17. Borrageiro G. A review of genome-wide transcriptomics studies in Parkinson's disease // *Eur J Neurosci*. 2018. P. 1-16.
18. Bossers K. Analysis of gene expression in Parkinson's disease: possible involvement of neurotrophic support and axon guidance in dopaminergic cell death // *Brain Pathol*. 2009. P. 91-107
19. Brauer R. Glitazone Treatment and Incidence of Parkinson's Disease among People with Diabetes: A Retrospective Cohort Study // *PLoS Med*. 2015. P. 85-86.
20. Cookson M.R. Cellular functions of LRRK2 implicate vesicular trafficking pathways in Parkinson's disease // *Biochem Soc Trans*. 2016. P. 1603-1610.
21. Cooper-Knock J. Gene expression profiling in human neurodegenerative disease // *Nat Rev Neurol*. 2012. p. 518-30.

22. Daniel R, Zerbino P.A., Wasiu Akanni // Ensembl genome [Электронный ресурс]. URL: <https://m.ensembl.org/index.html> (дата обращения 26.03.2019)
23. De Kosky S.T. Looking backward to move forward: early detection of neurodegenerative disorders // Science 2003. P. 830-834.
24. Dorsey E. The Parkinson pandemic— action // JAMA Neurol. 2018. P. 9-10.
25. Fahn, B.S., R. Elton. Committee, Unified Parkinson's Disease rating scale. Recent developments in Parkinson's disease // Florham Park, NY, Macmillan Health Care Information. 1987. P. 218-219.
26. Ferreira, M. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations // Acta Neurol Scand. 2017. P. 273-28.
27. Fornai F. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and alpha-synuclein // Proc Natl Acad Sci U S A. 2005. P. 3413-8.
28. Gleyzer N., Vercauteren K., Scarpulla R.C. Control of Mitochondrial Transcription Specificity Factors (TFB1M and TFB2M) by Nuclear Respiratory Factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 Family Coactivators // Mol Cell Biol. 2005. P. 1354-1366.
29. Goedert M. Familial Parkinson's disease. The awakening of alpha-synuclein // Nature. 1997. P. 232-233
30. Goetz C.G. Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations // Mov Disord. 2004. P. 1020-1028.
31. Goldstein D.S. The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks // Nat Cell Biol. 2011. P. 1376-82.
32. Grunblatt, E. Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes // J Neural Transm. 2004. P. 1543-73.

33. Heim B, Krismer F, De Marzi R. Magnetic resonance imaging for the diagnosis of Parkinson's disease // J Neural Transm. 2017. P. 915–964.
34. Henderson-Smith, A. Next-generation profiling to identify the molecular etiology of Parkinson dementia // Neurol Genet. 2016. P. 75.
35. Kadastik-Eerme, L, Taba, N, Taba, P. The increasing prevalence of Parkinson's disease in Estonia // Acta Neurol Scand. 2018. P. 251– 258.
36. Kasten M., Chade A. Tanner C.M. Epidemiology of Parkinson's disease. In: Parkinson's disease and related disorders // Advances in neurology, Vol.83, Part I (ed. W.C.Koller, E.Melamed). 2007. P. 129-151.
37. Lange R. Parkinson's disease in the elderly // Z Gerontol Geriatr. 2017. P.547-559
38. Lin, M.K. Genetics and genomics of Parkinson's disease // Genome Med, 2014. P. 48.
39. Lindersson, E. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers // J Biol Chem. 2004. P. 12924-34.
40. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method // Methods, 2001. P. 402-8
41. Madden T.L. The NCBI Handbook // The BLAST Sequence Analysis Tool [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (дата обращения 26.03.2019)
42. Mann H. B. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other // The Annals of Mathematical Statistics. 1947. P. 50-60
43. Mazzulli J.R. Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies // Cell. 2011. P. 37-52.
44. Miki, Y. Alteration of autophagy-related proteins in peripheral blood mononuclear cells of patients with Parkinson's disease // Neurobiol Aging. 2018. P. 33-43

45. Mizrachi, I. GenBank: The Nucleotide Sequence Database // The NCBI Handbook [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/> (дата обращения 26.03.2019)
46. Mizuno Y., Hattori N., Kubo S. Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2008. P. 2215-2227.
47. Mnoshevski SE. Molecular machinery engaged in synaptic transmitter release. Also used in "Nano and Molecular Electronics Handbook". Nano and Microengineering Series // Boca Raton: CRC Press. 2007. P. 17-41.
48. Moore D.J., West A.B., Dawson T.M. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease // *Annu. Rev. Neurosci.* 2005. P. 57-87.
49. Mootha V.K. Erralpha and Gabpa/b specify PGC 1alphadependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004. P. 6570-6575.
50. Mullin, S. Alpha-Synuclein and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease // *Mol Neurobiol.* 2013. P. 587-97.
51. Mutez, E. L. Transcriptional profile of Parkinson blood mononuclear cells with LRRK2 mutation // *Neurobiol Aging.* 2011. P. 1839-1848.
52. Neumann J. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease // *Brain.* 2009. P. 1783-94
53. Niethammer M., Feigin A., Eidelberg D. Functional neuroimaging in Parkinson's disease // In: *Additional Perspectives on Parkinson's Disease* (S. Przedborski, ed.). 2012. P. 1-21.
54. Obeso, J.A. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy // *MovDisord.* 2017. P. 1264-1310.
55. Osman AA, Saito M, Makepeace C. Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium // *J. Biol. Chem.* P. 278.

56. Park, J.S. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives // *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018. P. 21
57. Patti ME. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1 // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. P. 8466-71.
58. Pruitt, K. The Reference Sequence (RefSeq) Database // The NCBI Handbook [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (дата обращения 26.03.2019)
59. Rubinsztein D.C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration // *Nature*. 2006. P. 780-786
60. Ryan, B.J. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease // *Trends Biochem Sci*. 2015. P. 200-10
61. S. S. Demirsoy. ATP13A2/PARK9 regulates endo-/lysosomal cargo sorting and proteostasis through a novel PI(3, 5)P2-mediated scaffolding function // *Human Molecular Genetics*. 2017. P. 1656–1669
62. Saiki S., Sato S., Hattori N. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2012. P. 430-436.
63. Scarpulla R.C. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells // *J. Cell Biochem*. 2006. P. 673-683.
64. Scherzer, C.R., et al., Molecular markers of early Parkinson's disease based on gene expression in blood // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. P. 955-960.
65. Schiesling C., Kieper N., Kruger R. Familial Parkinson's disease – genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease // *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 2008. P. 255-271.
66. Schiesling C. Parkinson's disease – genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation // *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 2008. P. 265-271.
67. Schrag A, Schott JM. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset Parkinsonism // *Lancet Neurol*. 2006. P. 355–363

68. Shamir, R. Analysis of blood-based gene expression in idiopathic Parkinson disease // *Neurology*. 2017. P. 1676-1683
69. Simunovic, F. Gene expression profiling of substantia nigra dopamine neurons: further insights into Parkinson's disease pathology // *Brain*. 2009. P. 1795-809
70. Singleton A.B., Farrer M.J., Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications // *Mov. Disord*. 2013. P. 14-23.
71. Snyder H, Wolozin B. Pathological proteins in Parkinson's disease: focus on the proteasome // *J Mol Neurosci*. 2004. P. 425-42
72. Snyder, H. Aggregated and monomeric alpha-synuclein bind to the S6' proteasomal protein and inhibit proteasomal function // *J Biol Chem*. 2003. P. 11753-9
73. Soreq, L. Advanced microarray analysis highlights modified neuro-immune signaling in nucleated blood cells from Parkinson's disease patients // *J Neuroimmunol*. 2008. P. 227-236
74. Stafa, K. Functional interaction of Parkinson's disease-associated LRRK2 with members of the dynamin GTPase superfamily // *Hum Mol Genet*. 2014. P. 2055-77.
75. Takahashi-Niki, K. Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients // *Biochem Biophys Res Commun*. 2004. P. 389-97.
76. Takei D, Ishihara H, Yamaguchi S. WFS1 protein modulates the free Ca<sup>2+</sup> concentration in the endoplasmic reticulum // *FEBS Letters*. 2006. P. 5635–5640
77. Tang FL, Liu W, Hu JX. VPS35 deficiency or mutation causes dopaminergic neuronal loss by impairing mitochondrial fusion and function // *Cell Rep*. 2015. P. 1631–43.
78. Thomas B., Beal M.F. Parkinson's disease // *Hum. Mol. Genet*. 2007. P. 16-17

79. Tsika E. Parkinson's disease-linked mutations in VPS35 induce dopaminergic neurodegeneration // *HumMolGenet.* 2014. P. 4621-38
80. Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity // *Am J Epidemiol.* 2018. P. 1015–1022.
81. Vangeel EB, Pishva E, Hompes T. Newborn genome-wide DNA methylation in association with pregnancy anxiety reveals a potential role for GABBR1 // *Clin Epigenetics.* 2017. P. 107
82. Wakabayashi K. A presynaptic protein, immunoreactivity in Lewy bodies in Parkinson's disease // *Neurosci Lett.* 1997. P. 45-8
83. Westbroek W., Gustafson A.M., Sidransky E. Exploring the link between glucocerebrosidase mutations and parkinsonism // *Trends Mol. Med.* 2011. P. 485-493
84. Wickremaratchi MM, Perera D, O'Loghlen C. Prevalence and age of onset of Parkinson's disease in cardiff: a community based cross sectional study and meta-analysis // *JN eurolNeurosurgPsychiatry.* 2009. P. 805–807
85. Williams, E.T., X. Chen, and D.J. VPS35, the Retromer Complex and Parkinson's Disease // *J Parkinsons Dis.* 2017. P. 219-23
86. Zhou Y. Nuclear respiratory factor 1 promotes spheroid survival and mesenchymal transition in mammary epithelial cells // *Oncogene.* 2018. P. 6152-6165