

АССОЦИАЦИЯ rs356219 И rs356165 С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА И ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА АЛЬФА-СИНУКЛЕИНА В CD45⁺-КЛЕТКАХ КРОВИ

© А. К. Емельянов,^{1–3} П. А. Андоскин,¹ И. В. Милюхина,⁴ А. А. Тимофеева,²
А. Ф. Якимовский,² К. А. Сенкевич,² М. А. Николаев,^{1–3} С. Н. Пчелина^{1–4,*}

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова,
Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл., 188300,

² С.-Петербургский государственный первый медицинский университет им. акад. И. П. Павлова
Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197022,

³ С.-Петербургский национальный исследовательский Академический университет
РАН, Санкт-Петербург, 194021,

⁴ Институт экспериментальной медицины, РАМН, Санкт-Петербург, 197376;

* электронный адрес: sorchelina@hotmail.com

В настоящее время считается, что ключевым звеном в патогенезе болезни Паркинсона (БП) является агрегация пресинаптического белка альфа-синуклеина (SNCA). В ряде исследований выявлена связь риска развития БП с локусом, содержащим ген *SNCA*. По результатам зарубежных мета-анализов для полиморфных вариантов *SNCA* (rs356219 (A/G) и rs356165 (A/G)), показана высокозначимая ассоциация БП. В настоящем исследовании мы провели генотипирование указанных аллельных вариантов среди пациентов с БП (n = 260) и в контрольной группе (n = 262) в Северо-Западном регионе России. Обнаружено высокое неравновесное сцепление аллельных вариантов rs356219 и rs356165 ($D' = 0.926$) и подтверждено, что аллели G (rs356165 и rs356219) связаны с повышенным риском развития БП. Впервые оценили влияние аллельных вариантов rs356165 и rs356219 гена *SNCA* на уровень мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках периферической крови у пациентов с БП (n = 43), не получающих терапии Л-ДОФА-содержащими препаратами, и в контрольной группе (n = 39). Показано повышение уровня как мРНК гена *SNCA*, так и альфа-синуклеина у носителей аллеля G (rs356219 и rs356165) по сравнению с носителями генотипа AA среди лиц контрольной группы ($p = 0.046$ и $p = 0.039$ соответственно). Полученные данные позволяют говорить о том, что аллельные варианты rs356219 и rs356165 могут влиять на риск развития БП, увеличивая экспрессию гена *SNCA*.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона, альфа-синуклеин, факторы риска, ген *SNCA*, CD45⁺-клетки.

Принятые сокращения: БП — болезнь Паркинсона, ИФА — иммуноферментный анализ, мРНК — матричная РНК, миРНК — микроРНК, ОНП — однонуклеотидные полиморфные варианты, ПЛАГ — полиакриламидный гель, GWAS — полногеномные ассоциативные исследования.

Сегодня считается, что агрегация пресинаптического белка альфа-синуклеина (SNCA) является основной причиной гибели дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона (БП) (Eller, Williams, 2011; Giráldez-Pérez et al., 2014). В ряде исследований показано, что увеличение экспрессии гена альфа-синуклеина (*SNCA*) способствует формированию нейротоксических олигомерных форм альфа-синуклеина. Описан ряд семей с наследственной формой БП, обусловленной мультипликациями гена *SNCA* (Singleton et al., 2003). При этом наличие мультипликаций *SNCA* коррелирует с увеличением уровня белка альфа-синуклеина, который является одним из основных компонентов цитоплазматических белковых агрегатов в нейроне (телец Леви) как при наследственных, так и при спорадических формах БП (Miller et al., 2004; Devine et al., 2011).

Анализ результатов полногеномных ассоциативных исследований (GWAS), проведенных среди пациентов с БП, позволил выявить связь риска развития спорадической БП с локусом, содержащим ген *SNCA* (Venda et al., 2010; Lill et al., 2012; Han et al., 2014; Nalls et al., 2014). Описан целый ряд однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОНП) как в промоторной, так и в 3'-нетранслируемой областях *SNCA*, влияющих на риск развития БП (Maraganore et al., 2006; Pankratz et al., 2009; Edwards et al., 2010). По результатам мета-анализа зарубежных GWAS, высокозначимая связь с риском развития БП выявлена для аллелей G (rs356219 и rs356165). Ранее нами проведено репликативное исследование и показан повышенный риск развития БП у носителей аллеля G (rs356219) в Северо-Западном регионе России (Emelyanov et al., 2013).

Данные о влиянии ОНП в 3'-нетранслируемой области *SNCA* на уровень белка альфа-синуклеина периферической крови остаются противоречивыми (Fuchs et al., 2008; Mata et al., 2010). Подобные противоречия могут объясняться, в частности, отсутствием учета фактора гемолита, поскольку известно, что концентрация альфа-синуклеина в эритроцитах и тромбоцитах значительно превышает его концентрацию в мононуклеарных клетках крови (Barbour et al., 2008; Hong et al., 2010; Shi et al., 2011).

Целью настоящего исследования явилось изучение связи ОНП 3'-нетранслируемой области гена *SNCA* (rs356165) с риском развития БП, а также связи rs356219 и rs356165 гена *SNCA* с уровнем мРНК и белка альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках, полученных методом магнитного сортирования из цельной периферической крови пациентов с БП и контрольной группы.

Материал и методика

Обследуемые группы. В исследование включили 260 пациентов (средний возраст 63.8 ± 9.8 года, средний возраст начала заболевания 49 ± 10.9 года; 150 мужчин и 110 женщин) с установленным диагнозом БП и отсутствием других нейродегенеративных заболеваний. Критериями выбора служило сочетание хотя бы двух фенотипических проявлений, характерных для БП (гипокинезия, ригидность, тремор покоя и постуральная неустойчивость). Пациенты были обследованы в консультационно-диагностическом центре ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова и в центре нейродегенеративных заболеваний Института экспериментальной медицины РАНН.

Контрольная группа включала в себя 262 индивидуума (средний возраст 67.7 ± 8.8; 142 мужчины и 120 женщин), состоящих на учете в С.-Петербургском городском гериатрическом центре. Все члены контрольной группы проходили обследование у невролога с целью исключения диагноза БП и других нейродегенеративных заболеваний. Данная выборка является случайной и принадлежит к тому же географическому региону, что и включенная в анализ группа пациентов с БП. Исследование одобрено этическими комитетами указанных медицинских учреждений и проводилось при информированном согласии пациента. Включенная в исследование группа пациентов не отличалась от контрольной группы по полу и возрасту.

Идентификация ОНП rs356165 гена *SNCA*. Для обнаружения ОНП rs356165 гена *SNCA* разработан оригинальный метод на основе ПЦР с последующим рестрикционным анализом (эндонуклеаза рестрикции HruCH4V (New England Biolabs, Великобритания)). Подбор праймеров производили с использованием программы PrimerExpress 3.0 (For: 5'-ACAACAGTTCSSCA-AATGC-3', Rev: 5'-AAGACSSCAACTACTATTG-3'). Фрагменты ДНК подвергали электрофоретическому разделению в 8%-ном ПААГ с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией результатов в УФ-свете.

Получение фракции CD45⁺-клеток периферической крови. CD45⁺-клетки выделяли из 8 мл периферической крови центрифугированием в градиенте плотности раствора фикола (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare, Великобритания) с последующим проведением магнитного сортирования с использованием ручного сепаратора MACS (Miltenyi Biotec, США) и колонок miniMACS типа MS (Miltenyi Biotec, США) согласно прилагаемой

инструкции. Полученную клеточную смесь аликвотировали и замораживали при -70 °С.

Оценка уровня мРНК гена *SNCA*. Тотальную РНК выделяли из CD45⁺-клеток с использованием коммерческого набора RNeasy MiniKit (Qiagen, США) в соответствии с прилагаемой инструкцией. кДНК получали методом обратной транскрипции с использованием набора Revert Aid First cDNA Synthesis kit (ThermoScientific, Литва) согласно условиям фирмы-производителя и хранили при -70 °С.

Определение уровня мРНК гена *SNCA*, а также референсного гена *GNB2L1* (guanine nucleotide binding protein (G protein), betapolypeptide 2-like) проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени с использованием коммерческого набора, содержащего краситель-интеркалятор SYBR Green 1 (SsoI SyberGreen, Bio-Rad, США) на приборе CFX96 (BioRad, США). Оценку уровня мРНК указанных генов проводили с использованием разработанных с помощью программы PrimerExpress 3.0 праймеров (*SNCA*—FOR: 5'-TTCCAGTGTGGT-GTAAAGAAATTCAT-3', REV: 5'-CCTTGGCCTTTGAA-AGTCCTT-3'; *GNB2L1*- FOR: 5'-GAATACCCTGGGTGTGTGCAA-3', REV: 5'-GGACACAAGACACCTCT-GA-3'), которые отжигались в различных экзонах данных генах. В экспериментах использовали олигонуклеотиды фирмы «ДНК-синтез» (Москва). Каждый образец амплифицировали в трех повторах с целью минимизации отклонения результатов. Оценку относительного уровня мРНК гена *SNCA* проводили с использованием метода относительных измерений 2^{-ΔΔCt}.

Определение уровня белка альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках проводили методом ИФА с использованием набора Human alpha-synuclein ELISA kit (Invitrogen, США). Клетки лизировали с использованием набора Total Protein Extraction Kit (Chemicon (Millipore), США). Измерение общего белка в клеточных лизатах проводили набором Pierce BCA Protein Assaykit (ThermoScientific, США). В дальнейших экспериментах использовали образцы клеточных лизатов, выровненные по концентрации общего белка (6 мкг). Исследования каждого образца проводили в трех повторах. Оптическую плотность оценивали на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы SPSS 12.0. Определение соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов в популяциях равновесию Харди—Вайнберга, а также сравнение распределения генотипов между группами проводили с использованием критерия χ^2 .

Отношение шансов (OR) рассчитывали с 95%-ным доверительным интервалом (ДИ) по формуле: $OR = a/b \times d/c$, где a и b — количество больных, имеющих и не имеющих мутантного аллеля, c и d — количество человек контрольной группы, имеющих и не имеющих мутантный аллель соответственно. Границы доверительного интервала вычисляли по формулам $OR_{min} = OR^{(1-1.96/\sqrt{\chi^2})}$ и $OR_{max} = OR^{(1+1.96/\sqrt{\chi^2})}$, где $\chi^2 = ((a \times d - b \times c) - 0.5 \times n)^2 \times (n - 1) / (n_0 \times n_1 \times m_0 \times m_1)$; $n_1 = a + b$; $n_0 = c \times d$; $m_1 = a + c$; $m_0 = b + d$; $n = n_1 + n_0 + m_1 + m_0$.

Анализ неравновесия по сцеплению ОНП rs356219 и rs356165 гена *SNCA* проводили с использованием программного обеспечения Haploview (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>).

Частоты генотипов A/G rs356165 гена SNCA у пациентов с БП и в контрольной группе

БП, % (n = 260)			Контроль, % (n = 262)			OR
AA	AB	BB	AA	AB	BB	
31.2	51.9	16.9	40.8	46.6	12.6	(GG + AG vs. AA) = 1.53 [95%-ный доверительный интервал: 1.06—2.19], $p = 0.03$

Примечание. А — наиболее распространенный аллель, В — редкий аллель, AA — гомозигота по наиболее распространенному аллелю, AB — гетерозигота, BB — гомозигота по редкому аллелю; OR — отношение шансов (см. текст).

Проверку полученных вариационных рядов на соответствие нормальному распределению проводили методом Шапиро—Уилка. Полученные данные трансформировали путем логарифмирования и в соответствии нормальному распределению сравнивали с использованием t -критерия Стьюдента.

Значения $p < 0.05$ считали статистически значимыми. Данные представлены в виде медиан, значения которых по тексту представлены в следующем виде: «медиана (мин, макс)».

Использованные реактивы: Эндонуклеаза рестрикции HpyCH4V (NewEnglandBiolabs, Великобритания); MACS (Miltenyi Biotec, США); miniMACS типа MS (MiltenyiBiotec, США); RNeasy MiniKit (Qiagen, США); Revert Aid First cDNA Synthesis kit (ThermoScientific, Литва); SYBRGreen 1 (SsoIlyberGreen, Bio-Rad, США); Human alpha-synuclein ELISA kit (Invitrogen, США); Pierce BCA Protein Assay kit (ThermoScientific, США).

Результаты

В настоящем исследовании провели оценку частоты генотипов по rs356165 гена SNCA среди пациентов с БП и индивидуумов контрольной группы Северо-Западного региона России. Распределение генотипов в исследуемых выборках соответствовало равновесию Харди—Вайнберга. Выявили различия в частоте встречаемости носителей аллеля G в группе пациентов с БП по сравнению с контролем ($p = 0.03$) и показали, что носительство аллеля G (генотипы GG + AG) увеличивает риск развития заболевания в 1.53 раза (см. таблицу).

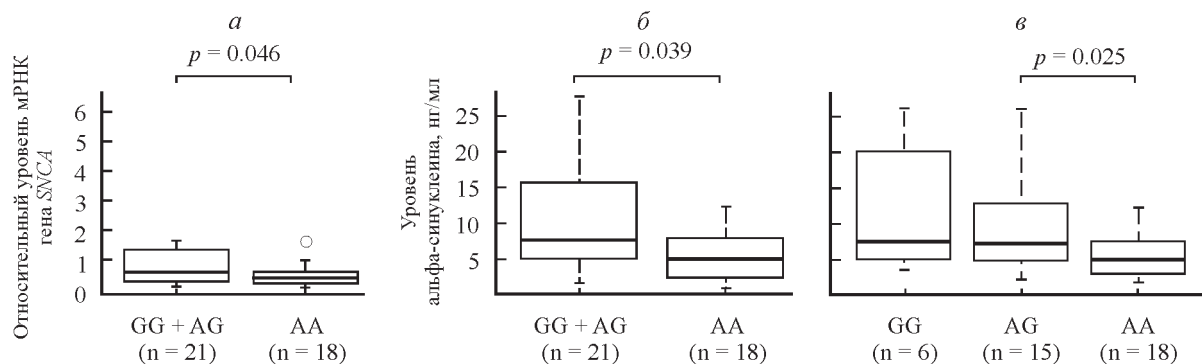
В ходе исследования создан банк CD45⁺-клеток периферической крови пациентов с БП (n = 43, 12 мужчин,

средний возраст 60 ± 7 лет) и лиц контрольной группы (n = 39, 18 мужчин, средний возраст 61 ± 9 лет). Относительный уровень мРНК гена SNCA составил для пациентов с БП 0.53 (0.0006—7.33) и для контрольной группы 0.71 (0.0—6.67). Различий в уровне мРНК гена SNCA между исследуемыми группами не выявили ($p = 0.48$). Уровень альфа-синуклеина в исследуемых группах составил у пациентов с БП 5.05 нг/мл (1.5—36.80), а в соответствующей по возрасту контрольной группе — 6.59 (1.21—28.10). Различий в уровне альфа-синуклеина между группой пациентов с БП и контрольной группой не выявлено ($p = 0.28$).

Также в настоящем исследовании провели тестирование неравновесного сцепления ОНП гена SNCA rs356165 с rs356219, связь с риском БП которого выявлена нами ранее (Emelyanov et al., 2013). Показатель неравновесности D' рассчитывали для общей выборки (n = 522). Он составил 0.926, что свидетельствует о высоком неравновесном сцеплении rs356219 с rs356165 гена SNCA для жителей Северо-Западного региона России. Поскольку ОНП rs356219 и rs356165 в подгруппе пациентов и в контрольной группе, отобранной для оценки экспрессии гена SNCA в CD45⁺-клетках, показали 100%-ное сцепление, ниже представлены данные только для rs356219.

В результате оценки влияния ОНП rs356219 и rs356165 гена SNCA на уровень мРНК SNCA и альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках в группе пациентов с БП и в контрольной группе показали повышение уровня как мРНК гена SNCA, так и альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках крови у носителей аллеля G по сравнению с носителями генотипа AA среди лиц контрольной группы ($p = 0.046$ и $p = 0.039$ соответственно; см. рисунок, а, б).

Мы провели сопоставление уровня альфа-синуклеина и мРНК гена SNCA в CD45⁺-клетках у носителей различ-



Относительный уровень мРНК гена SNCA (а) и уровень белка альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках периферической крови у носителей аллеля G (генотипы GG + AG) и генотипа AA контрольной группы (б) и у носителей различных генотипов (rs356219) гена SNCA в контрольной группе (в).

Данные представлены в виде медиан с нижним и верхним квартилями, также указано максимальное значение выборки. В скобках указано число носителей генотипа.

ных генотипов ОНП rs356219 и rs356165 гена *SNCA* (генотипы AA, GG и AG) в контрольной группе и в группе пациентов с БП. В контрольной группе у носителей генотипа AG по сравнению с носителями генотипа AA обнаружено увеличение уровня альфа-синуклеина ($p = 0.025$; см. рисунок, в). У пациентов с генотипом GG по сравнению с носителями генотипа AA rs356219 также отмечалось некоторое увеличение уровня альфа-синуклеина ($p = 0.07$; см. рисунок, в). При оценке влияния rs356219 и rs356165 *SNCA* на уровень мРНК *SNCA* и альфа-синуклеина в CD45⁺-клетках среди пациентов с БП различий между группами носителей генотипов GG + AG и AA, а также и между группами пациентов — носителей генотипов GG, AG и AA не показано.

Обсуждение

Расшифровка генома человека и развитие исследований GWAS революционизировали подходы к выявлению локусов риска развития заболеваний. Данный подход позволяет оценивать вклад в патогенез заболеваний полиморфных локусов, частота аллельных вариантов которых превосходит 5 %. Так, связь различных вариантов ОНП гена *SNCA* с развитием БП продемонстрирована в ряде ассоциативных исследований и подтверждена GWAS (Maraganore et al., 2006; Sellbach et al., 2006; Han et al., 2014; Nalls et al., 2014).

В настоящем исследовании нами впервые для российской популяции показано увеличение риска развития БП при наличии аллеля G (rs356165) гена *SNCA* в 1.5 раза, что согласуется с зарубежными данными. Так, в исследовании Кардо с соавторами показано увеличение риска развития БП в 1.4 раза у носителей аллеля G (rs356165) и связь данного ОНП с ранней формой развития БП (Cardo et al., 2012). Также данная связь показана в исследованиях других авторов (Ross et al., 2007; Ritz et al., 2012). Отсутствие связи этого генетического варианта с БП показано для китайской популяции (Hu et al., 2012), что указывает на необходимость проведения репликативных исследований для оценки данного полиморфного варианта в разных этнических популяциях. Связь с риском развития БП показана и для других ОНП гена *SNCA* (Han et al., 2014). Так, во многих популяциях мира, в том числе и в России, многократно подтвержден повышенный риск развития БП у носителей аллеля G(rs356219) (Lill et al., 2012; Emelyanov et al., 2013). В настоящем исследовании нами подтверждено выявленное ранее высокое неравное сцепление аллельных вариантов rs356165 и rs356219 гена *SNCA* (Muyhr et al., 2008). Мы оценили влияние аллельных вариантов rs356165 и rs356219 на уровень мРНК гена *SNCA* и белка альфа-синуклеина в однородной фракции CD45⁺-клеток периферической крови у пациентов с БП и в контрольной группе. Использование метода магнитного сортирования после центрифугирования периферической крови в градиенте фикола и получения однородной фракции CD45⁺-клеток позволило исключить контаминацию образцов альфа-синуклеином эритроцитов. Следует отметить, что основная часть альфа-синуклеина периферической крови находится в эритроцитах, а это в свою очередь в результате их гемолиза может влиять на конечную концентрацию альфа-синуклеина в образце (Varboag et al., 2008; Shi et al., 2010). Между тем метод фикольного центрифугирования не позволяет провести полную фильтрацию периферической крови, и

примесь эритроцитов в получаемой над фиколом лимфоцитарной фракции, по данным литературы, составляет 5 ± 2 % (Vöyum, 1968a, 1968b). При этом следует отметить, что именно лимфоциты периферической крови могут отражать ряд биохимических процессов, происходящих в дофаминергических нейронах, включая снижение протеасомной активности, повышение активности каспаз, изменение содержания дофамина и дофаминовых транспортеров (Barbanti et al., 1999; Blandini et al., 2006; Pellicano et al., 2007).

В настоящем исследовании нами впервые показана ассоциация аллеля G (rs356219 и rs356165) с повышением экспрессии *SNCA* в CD45⁺-клетках крови в контрольной группе. Аналогично полученным нами результатам Mata с соавторами показали ассоциацию аллеля G (rs356219) с повышенным уровнем альфа-синуклеина плазмы периферической крови (Mata et al., 2010). Однако данная ассоциация выявлена у пациентов с БП. В настоящем исследовании нами не выявлено связи данных ОНП с изменением уровня измеряемых параметров в группе пациентов с БП. В работе Фукс с соавторами по влиянию rs356219 на экспрессию гена *SNCA* и уровень белка альфа-синуклеина в лимфоцитарной фракции периферической крови как у пациентов с БП, так и в контроле различий не наблюдали (Fuchs et al., 2008). Следует отметить, что в данных исследованиях не учитывали контаминацию образцов эритроцитами, а группа пациентов состояла из лиц, принимающих Л-ДОФА-содержащие препараты, которые, как показало недавнее исследование, могут влиять на эпигенетическую регуляцию экспрессии гена *SNCA* (Schmitt et al., 2015). В настоящее исследование включены пациенты с БП на ранних сроках развития заболевания, не принимавшие данных препаратов.

Механизм влияния ОНП в 3'-области гена *SNCA*, ассоциированных с риском развития БП, на уровень экспрессии *SNCA* остается неизвестным. Существует несколько объяснений наблюдаемому увеличению уровня мРНК у носителей аллелей исследуемых ОНП, ассоциированных с БП.

Показано, что в зависимости от вида клеток человека молекула мРНК гена *SNCA* может иметь 4 варианта протяженности, и только первые 574 нуклеотида обладают высокой консервативностью и обнаруживаются в 95 % молекул мРНК данного гена (Sotiriou et al., 2009). Следует отметить, что из всех известных ОНП, располагающихся в 3'-нетранслируемой области *SNCA* и ассоциированных с повышенным риском БП, только rs356165 действительно локализован в ней внутри области ретротранспозона LINE (Long Interspersed Nuclear Elements), которая обнаруживается лишь в 5 % всех молекул мРНК гена *SNCA*. Несмотря на эти данные, молекулярный механизм влияния указанного ОНП на риск развития БП остается неясным. Обсуждается несколько механизмов регуляции экспрессии *SNCA*, ассоциированных с наличием ОНП в его 3'-нетранслируемой области. Первый механизм заключается в возможном удлинении мРНК за счет наличия в 3'-нетранслируемой области нескольких полиадениловых повторов, связанных с образованием транскриптов данного гена различной длины (Sotiriou et al., 2009). Влияние ОНП rs356165 на длину транскрипта маловероятно, поскольку данный ОНП лежит вне сайтов полиаденилирования. Второй механизм влияния ОНП rs356165 на экспрессию *SNCA* может заключаться в изменениях сайтов связывания мРНК, приводящих к их созданию или разрушению. Ранее было показано, что не-

которые миРНК вовлечены в посттранскрипционную регуляцию экспрессии *SNCA* (Doxakis, 2010). В исследованиях *in silico* влияния данного ОНП на связывание известных миРНК не обнаружено (Cardo et al., 2012), что, скорее всего, исключает возможность влияния на экспрессию гена посредством данного механизма.

Наиболее вероятным представляется третий механизм, заключающийся в неравновесном сцеплении ОНП rs356165 гена *SNCA* с другими генетическими вариантами, а именно ОНП генов, которые расположены как с 5'-, так и с 3'-концов *SNCA*. В частности, можно предположить сцепление исследованных нами ОНП с функционально значимым вариантом в промоторной области REP1 263bp, связанным с изменением уровня экспрессии *SNCA* (Chiba-Falek et al., 2001). Следует отметить, что сцепление между ОНП rs356219, rs356165 и REP1 263bp продемонстрировано ранее (Myhre et al., 2008). Немаловажным представляется тот факт, что ОНП rs356219 расположен в интроне некодирующей РНК (*RP11-115D19.1*) ниже гена *SNCA*. В экспериментах на нейрональных клеточных культурах показано, что ее нокдаун приводит к значительному увеличению экспрессии гена *SNCA* (Mizuta et al., 2013), свидетельствуя о возможном непосредственном участии данного ОНП в процессе формирования профиля экспрессии гена *SNCA*.

Таким образом, полученные нами данные позволяют предполагать, что аллели G (rs356219 и rs356165) могут влиять на риск развития БП в результате их связи с повышением экспрессии гена *SNCA*, что сопровождается увеличением количества альфа-синуклеина в клетках.

Выражаем большую благодарность всем пациентам и лицам контрольной группы за принятие участия в данном исследовании.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 13-04-01510 А, 16-54-76009 ЭРА_а и 16-04-01187).

Список литературы

- Blandini F., Sinforiani E., Pacchetti C., Samuele A., Bazzini E., Zangaglia R., Nappi G., Martignoni E. 2006. Peripheral proteasome and caspase activity in Parkinson disease and Alzheimer disease. *Neurology*. 66 : 529—534.
- Böyum A. 1968a. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97 : 31—50.
- Böyum A. 1968b. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97 : 31—50.
- Cardo L. F., Coto E., de Mena L., Ribacoba R., Lorenzo-Betancor O., Pastor P., Samaranch L., Mata I. F., Díaz M., Moris G., Menéndez M., Corao A. I., Alvarez V. 2012. A search for *SNCA* 3' UTR variants identified SNP rs356165 as a determinant of disease risk and onset age in Parkinson's disease. *J. Mol. Neurosci.* 47 : 425—430.
- Chiba-Falek O., Nussbaum R. L. 2001. Effect of allelic variation at the NACP-Rep1 repeat upstream of the alpha-synuclein gene (*SNCA*) on transcription in a cell culture luciferase reporter system. *Hum. Mol. Genet.* 10 : 3101—3109.
- Devine M. J., Gwinn K., Singleton A., Hardy J. 2011. Parkinson's disease and alpha-synuclein expression. *Mov. Disord.* 26 : 2160—2168.
- Doxakis E. 2010. Post-transcriptional regulation of alpha-synuclein expression by mir-7 and mir-153. *J. Biol. Chem.* 285 : 12 726—12 734.
- Edwards T. L., Scott W. K., Almonte C., Burt A., Powell E. H., Beecham G. W., Wang L., Zuchner S., Konidari I., Wang G., Singer C., Nahab F., Scott B., Stajich J.M., Pericak-Vance M., Haines J., Vance J. M., Martin E. R. 2010. Genome-wide association study confirms SNPs in *SNCA* and the *MAPT* region as common risk factors for Parkinson's disease. *Ann. Hum. Genet.* 74 : 97—109.
- Eller M., Williams D. R. 2011. alpha-Synuclein in Parkinson disease and other neurodegenerative disorders. *Clin. Chem. Lab. Med.* 49 : 403—408.
- Emelyanov A., Andoskin P., Yakimovskii A., Usenko T., Nuzhnyi E., Nikolaev M., Pchelina S. 2013. *SNCA*, *LRRK2*, *MAPT* polymorphisms and Parkinson's disease in Russia. *Parkinsonism and Related Disorders*. 19 : 1064—1065.
- Fuchs J., Tichopad A., Golub Y., Munz M., Schweitzer K.J., Wolf B., Berg D., Mueller J.C., Gasser T. 2008. Genetic variability in the *SNCA* gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *J. FAEB.* 22 : 1327—1334.
- Giráldez-Pérez R., Antolin-Vallespín M., Muñoz M., Sánchez-Capelo A. 2014. Models of alpha-synuclein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 2 : 176.
- Han W., Yingjun M., Jing Z., Dianwu L., Quingbao T. 2014. Alpha-synuclein (*SNCA*) polymorphisms and susceptibility to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Amer. J. Med. Genet. Part B.* 9999 : 1—12.
- Hong Z., Shi M., Chung K. A., Quinn J. F., Peskind E. R., Galasko D., Jankovic J., Zabetian C. P., Leverenz J. B., Baird G., Montine T. J., Hancock A. M., Hwang H., Pan C., Bradner J., Kang U. J., Jensen P. H., Zhang J. 2010. DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain*. 133 : 713—726.
- Hu Y., Tang B., Guo J., Wu X., Sun Q., Shi C., Hu L., Wang C., Wang L., Tan L., Shen L., Yan X., Zhang H. 2012. Variant in the 3' region of *SNCA* associated with Parkinson's disease and serum alpha-synuclein levels. *J. Neurol.* 259 : 497—504.
- Lill C. M., Roehr J. T., McQueen M. B., Kavvoura F. K., Bagade S., Schjeide B. M., Schjeide L. M., Meissner E., Zauft U., Allen N. C., Liu T., Schilling M., Anderson K. J., Beecham G., Berg D., Biernacka J. M., Brice A., DeStefano A. L., Do C. B., Eriksson N., Factor S. A., Farrer M. J., Foroud T., Gasser T., Hamza T., Hardy J. A., Heutink P., Hill-Burns E. M., Klein C., Latourelle J. C., Maraganore D. M., Martin E. R., Martinez M., Myers R. H., Nalls M. A., Pankratz N., Payami H., Satake W., Scott W. K., Sharma M., Singleton A. B., Stefansson K., Toda T., Tung J. Y., Vance J., Wood N. W., Zabetian C. P.; International Parkinson's Disease Genomics Consortium; Parkinson's Disease GWAS Consortium; Young P., Tanzi R. E., Khoury M. J., Zipp F., Lehrach H., Ioannidis J. P., Bertram L. 2012. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's Disease Genetics: the PDGene database. *PLoS Genet.* 8 : e1002548.
- Maraganore D. M., de Andrade M., Elbaz A., Farrer M. J., Ioannidis J. P., Kruger R., Rocca W. A., Schneider N. K., Lesnick T. G., Lincoln S. J., Hulihan M. M., Aasly J. O., Ashizawa T., Chartier-Harlin M.-C., Checkoway H., Ferrarese C., Hadjigeorgiou G., Hattori N., Kawakami H., Lambert J.-C., Lynch T., Mellick G. D., Papapetropoulos S., Parsian A., Quattrone A., Riess O., Tan E.-K., Broeckhoven C. V. 2006. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson's disease. *JAMA*. 296 : 661—670.
- Mata I. F., Shi M., Agarwal P., Chung K. A., Edwards K. L., Factor S. A., Galasko D. R., Ghingina C., Griffith A., Higgins D. S., Kay D. M., Kim H., Leverenz J. B., Quinn J. F., Roberts J. W., Samii A., Snapinn K. W., Tsuang D. W., Yearout D., Zhang J., Payami H., Zabetian C. P. 2010. *SNCA* variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Arch. Neurol.* 67 : 1350—1356.
- Miller D. W., Hague S. M., Clarimon J., Baptista M., Gwinn-Hardy K., Cookson M. R., Singleton A. B. 2004. Alpha-sy-

nuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology*. 62 : 1835—1838.

Mizuta I., Takafuji K., Ando Y., Satake W., Kanagawa M., Kobayashi K., Nagamori S., Shinohara T., Ito C., Yamamoto M., Hattori N., Murata M., Kanai Y., Murayama S., Nakagawa M., Toda T. 2013. YY1 binds to α -synuclein 3'-flanking region SNP and stimulates antisense noncoding RNA expression. *J. Hum. Genet.* 58 : 711—719.

Myhre R., Toft M., Kachergus J., Hulihan M. M., Aasly J. O., Klungland H., Farrer M. J. 2008. Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population. *Acta Neurol. Scand.* 118 : 320—327.

Nalls M. A., Pankratz N., Lill C. M., Do C. B., Hernandez D. G., Saad M., DeStefano A. L., Kara E., Bras J., Sharma M., Schulte C., Keller M. F., Arepalli S., Letson C., Edsall C., Stefansson H., Liu X., Pliner H., Lee J. H., Cheng R.; International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC); Parkinson's Study Group (PSG) Parkinson's Research: The Organized GENetics Initiative (PROGENI); 23andMe; GenePD; NeuroGenetics Research Consortium (NGRC); Hussman Institute of Human Genomics (HIHG); Ashkenazi Jewish Dataset Investigator; Cohorts for Health and Aging Research in Genetic Epidemiology (CHARGE); North American Brain Expression Consortium (NABEC); United Kingdom Brain Expression Consortium (UKBEC); Greek Parkinson's Disease Consortium; Alzheimer Genetic Analysis Group, Ikrum M. A., Ioannidis J. P., Hadjigeorgiou G. M., Bis J. C., Martinez M., Perlmutter J. S., Goate A., Marder K., Fiske B., Sutherland M., Xiomerisiou G., Myers R. H., Clark L. N., Stefansson K., Hardy J. A., Heutink P., Chen H., Wood N. W., Houlden H., Payami H., Brice A., Scott W. K., Gasser T., Bertram L., Eriksson N., Foroud T., Singleton A. B. 2014. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 46 : 989—993.

Pankratz N., Wilk J. B., Latourelle J. C., DeStefano A. L., Halter C., Pugh E. W., Doheny K. F., Gusella J. F., Nichols W. C., Foroud T., Myers R. H.; PSG-PROGENI and GenePD Investigators, Coordinators and Molecular Genetic Laboratories. 2009. Genome-wide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Hum. Genet.* 124 : 593e605.

Pellicano C., Buttarelli F. R., Circella A., Tiple D., Giovannelli M., Benincasa D., Colosimo C., Pontieri F. E. 2007. Dopamine

transporter immunoreactivity in peripheral blood lymphocytes discriminates Parkinson's disease from essential tremor. *J. Neural Transm.* 114 : 935—938.

Ritz B., Rhodes S. L., Bordelon Y., Bronstein J. 2012. α -Synuclein genetic variants predict faster motor symptom progression in idiopathic Parkinson disease. *PLoS ONE*. 7 : e36199.

Ross O. A., Gosal D., Stone J. T., Lincoln S. J., Heckman M. G., Irvine G. B., Johnston J. A., Gibson J. M., Farrer M. J., Lynch T. 2007. Familial genes in sporadic disease: common variants of alpha-synuclein gene associate with Parkinson's disease. *Mech. Ageing Develop.* 128 : 378—382.

Schmitt I., Kaut O., Khazneh H., deBoni L., Ahmad A., Berg D., Klein C., Frohlich H., Wullner U. 2015. L-dopa increases α -synuclein DNA methylation in Parkinson's disease patients *in vivo* and *in vitro*. *Mov. Disord.* 14 : doi: 10.1002/mds.26319.

Sellbach A. N., Boyle R. S., Silburn P. A., Mellick G. D. 2006. Parkinson's disease and family history. *Parkinsonism Relat. Disord.* 12 : 399—409.

Shi M., Bradner J., Hancock A. M., Chung K. A., Quinn J. F., Peskind E. R., Galasko D., Jankovic J., Zabetian C. P., Kim H. M., Leverenz J. B., Montine T. J., Ginchina C., Kang U. J., Cain K. C., Wang Y., Aasly J., Goldstein D., Zhang J. 2011. Cerebrospinal fluid biomarkers for Parkinson disease diagnosis and progression. *Ann. Neurol.* 69 : 570—580.

Singleton A. B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M. R., Muentner M., Baptista M., Miller D., Blacato J., Hardy J., Gwinn-Hardy K. 2003. Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 302 : 841.

Sotiriou S., Gibney G., Baxevas A. D., Nussbaum R. L. 2009. A single nucleotide polymorphism in the 3'UTR of the SNCA gene encoding alpha-synuclein is a new potential susceptibility locus for Parkinson disease. *Neurosci. Lett.* 461 : 196—201.

Venda L. L., Cragg S. J., Buchman V. L., Wade-Martins R. 2010. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease. *Trends in Neurosci.* 33 : 559—568.

Поступила 2 XI 2015

SNCA rs356219 AND rs356165 VARIANTS ARE ASSOCIATED WITH PARKINSON'S DISEASE AND INCREASED ALPHA-SYNUCLEIN GENE EXPRESSION IN THE CD45⁺-BLOOD CELLS

A. K. Emelyanov,^{1–3} P. A. Andoskin,¹ I. V. Miliukhina,⁴ A. A. Timofeeva,² A. F. Yakimovskii,² K. A. Senkevich,² M. A. Nikolaev,^{1–3} S. N. Pchelina^{1–4}

¹ National Research Centre «Kurchatov Institute» Petersburg Nuclear Physics Institute, Gatchina, Leningrad district, 188300,

² I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, 197022,

³ St. Petersburg Academic University — Nanotechnology Research and Education Centre of the RAS (the Academic University), St. Petersburg, 194021, and

⁴ Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376;

* e-mail: sopcheli:na@hotmail.com

Impaired metabolism of alpha-synuclein (SNCA) and its aggregation are now implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease (PD). Previous studies have found association between PD and gene locus, containing the SNCA gene. Meta-analysis have shown high significant association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs356165 (A/G) and rs356219 (A/G) in the SNCA gene with PD. We genotyped these SNPs in 260 PD patients and 262 controls from north-western region of Russia. Alleles «G» of rs356165 and rs356219 were associated with increased risk of PD development. Linkage disequilibrium was shown between associated marker alleles. We studied the relationship between rs356165 and rs356219 and levels of mRNA SNCA and alpha-synuclein in CD45⁺ peripheral blood cells in drug-naïve PD patients (n = 43) and controls (n = 39). Alleles «G» of rs356165 and rs356219 were associated with increased levels of SNCA expression (p = 0.046) and high alpha-synuclein levels (p = 0.039) in controls. Our data suggest that rs356165 and rs356219 variants might influence on PD development by upregulating SNCA expression.

Key words: Parkinson's disease, alpha-synuclein, risk factors, CD45⁺ cells, gene expression.