

ANALYSIS OF RS34637584 POLYMORPHISM IN THE LRRK2 GENE IN PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE

ANALIZA POLIMORFIZMA RS34637584 U GENU LRRK2 KOD BOLESNIKA SA PARKINSONOVOM BOLEŠĆU

Boba Kotlica¹, Momčilo Ristanović², Ivana Novaković²

¹ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za humanu genetiku, Beograd, Srbija

Correspondence: boba.bg.kotlica@gmail.com

Abstract

Introduction: Parkinson's disease (PD) belongs to neurodegenerative diseases, and since the prevalence is 1% to 2% in people older than 65 years and over 4% in people older than 85 years, it is the second most common disease in this group. The cause of PD is the death of dopaminergic neurons in the CNS, primarily in the basal ganglia and the substantia nigra. The LRRK2/PARK8 gene is located on the short arm of chromosome 12. There are many variants in this gene associated with PD, and the most common of which is mutation c.6055G>A (p.Gly2019Ser), also referred to as rs34637584.

Aim: The aim of this study was to determine the frequency of the c.6055G>A (rs34637584) mutation in the LRRK2 gene in a group of patients with PD from Serbia.

Material and methods: The study included a group of 127 patients with PD from tertiary healthcare institutions in Serbia, as well as an appropriate control group without neurological diseases. Molecular genetic analysis was performed by real-time PCR, using a commercial TaqMan assay.

Results: Mutation c.6055G>A ie. rs34637584 variant was detected in 1 of 127 examinees with PD (0.7%). That patient was without a previous family history of PD. This mutation was not found in the control group.

Conclusion: The results obtained align with findings of previous studies for the European, especially the southern European population. If these results would be confirmed in a larger patient sample, testing of LRRK2 mutation c.6055G>A (rs34637584) should become part of the PD test protocol.

Keywords:

LRRK2,
rs34637584,
Parkinson's disease,
real-time PCR

Sažetak

Uvod: Parkinsonova bolest (PB) pripada neurodegenerativnim oboljenjima. Sa prevalencijom od 1% do 2% kod osoba starijih od 65 godina i preko 4% kod starijih od 85 godina druga je po učestalosti u ovoj grupi bolesti. U osnovi PB se nalazi odumiranje dopaminergičkih neurona u centralnom nervnom sistemu (CNS), pre svega u oblasti bazalnih ganglija i supstance nigre. Gen LRRK2/PARK8 nalazi se na kratkom kraku hromozoma 12. U ovom genu su opisane različite varijante udružene sa PB, od kojih je najčešća mutacija c.6055G>A (p.Gly2019Ser), označena u RefSNP katalogu i kao rs34637584 varijanta.

Cilj: Cilj ovog istraživanja je da se utvrdi učestalost mutacije c.6055G>A (rs34637584) u genu LRRK2 kod grupe bolesnika sa PB iz Srbije.

Materijal i metode: Ispitivanjem je obuhvaćena grupa od 127 bolesnika sa PB iz zdravstvene ustanove tercijarnog nivoa u Srbiji, kao i odgovarajuća kontrolna grupa bez neuroloških bolesti. Molekularno-genetička analiza je sprovedena metodom praćenja polimerazne lančane reakcije u realnom vremenu (rngl. real-time PCR), upotrebom komercijalnog TaqMan SNP Genotyping seta reagensa.

Rezultati: Mutacija c.6055G>A, tj. rs34637584 varijanta detektovana je kod 1 od 127 ispitanika sa PB (0,7%), kod bolesnice bez prethodne porodične medicinske istorije PB. Ova mutacija nije nađena u kontrolnoj grupi.

Zaključak: Dobijeni rezultati odgovaraju podacima iz literature za evropsku, posebno južnoevropsku populaciju. Testiranje mutacije LRRK2 c.6055G>A trebalo bi, nakon provere na većem uzorku obolelih, uvrstiti u protokol ispitivanja PB.

Ključne reči:

LRRK2,
rs34637584,
Parkinsonova bolest,
PCR u realnom
vremenu

Uvod

Parkinsonova bolest (PB) pripada neurodegenerativnim oboljenjima. Sa prevalencijom od 1% do 2% kod osoba starijih od 65 godina i preko 4% kod starijih od 85 godina druga je po učestalosti u ovoj grupi bolesti. Kao glavni znaci bolesti, klinički je karakterišu bradikinezija, tj. usporenost pokreta, tremor, tj. podrhtavanje koje se javlja u miru, rigor, tj. ukrućenost i posturalna nestabilnost, tj. nestabilnost posle ustajanja (1). Osim navedenih, kod PB se javljaju i drugi motorni i nemotorni simptomi i znaci. U osnovi PB se nalazi odumiranje dopaminergičkih neurona u centralnom nervnom sistemu (CNS), pre svega u oblasti bazalnih ganglija i supstance nigre (2). U svojoj tipičnoj formi PB se ispoljava posle 65. godine života i ima multifaktorsku osnovu, što znači da u nastanku bolesti ulogu ima interakcija genetičkih i sredinskih faktora. Postoje i oblici PB ranog početka, kada je bolest često familijarna, sa uočljivim dominantnim ili recesivnim obrascem nasleđivanja. Zanimljivo je da geni odgovorni za PB ranog početka imaju svoj udeo i u etiologiji tipične, kasne forme PB (2). U celini, genetička osnova PB je složena. Do danas je utvrđeno barem 28 lokusa u genomu čoveka koji se mogu povezati sa nastankom bolesti, koji su označeni kao PARK lokusi, sa hronološki dodeljenim brojevima od PARK1 nadalje.

Gen LRRK2 je mapiran na lokusu PARK8, na kratkom kraku hromozoma 12, u regionu 12p12 (3). Ovaj gen kodira jednu kinazu bogatu aminokiselinom leucin, odakle i potiče naziv leucinom bogata ponavljajuća kinaza 2 (engl. *Leucin Repeat Rich Kinase 2*, LRRK2). Gen LRRK2 zauzima 144kb i ima 51 egzon. Proteinski produkt gena LRRK2 sastoji se od 2527 aminokiselina. Ovaj molekul se sastoji iz više domena, od kojih je najznačajniji domen sa funkcijom adenozin trifosfat (ATP) proteinske

fosfotransferaze, tj. mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPKKK, MAP3K) (3,4). Protein kodiran LRRK2 genom je nazvan dardarin, prema baskijskoj reči "*dardara*" koja znači tremor, jer je prva mutacija identifikovana kod članova porodice sa PB iz Baskije koji su imali tremor kao predominantni simptom (5).

Protein LRRK2 je kinaza sa svojstvom autofosforilacije, ali i fosforilacije drugih supstrata i deluje u formi dimera. Ekspimiran je u centralnom nervnom sistemu, ali i u većini drugih sistema organa; nađen je i u ćelijama imunskog sistema. U pogledu unutarćelijske lokalizacije, ovaj protein se nalazi u citoplazmi i spoljašnjoj membrani mitohondrija, kao i u drugim strukturama, na primer u lipidnim splavovima plazma membrane, endozoma, lizozoma, transportnih i sinaptičkih vezikula, Goldžijevog aparata i vezan je za mikrotubule (4).

Precizna funkcija proteina LRRK2 do sada nije poznata, ali se na osnovu njegove ekspresije, lokalizacije i strukture može zaključiti da učestvuje u većem broju ćelijskih procesa. Jedna od mogućih uloga ovog proteina je u homeostazi dopamina i vezikularnom transportu. Utvrđeno je da mutacije u genu LRRK2 imaju uticaj na neurotransmisiju dopamina i oslobađanje kateholamina, kao i da su povezane sa gubitkom dopaminergičkih neurona (6). Savremena istraživanja na različitim modelima sistema imaju za cilj da dovedu do razvoja novih terapijskih aspekata, kao i strategija korekcije fenotipskih efekata mutacije na LRRK2 genu i formiranja principa odabira optimalnih kandidata za ciljani tretman (7-11).

Mutacije gena LRRK2 imaju dominantan karakter, a prema publikovanim podacima učestalost pojedinih mutacija kod obolelih sa PB razlikuje se u zavisnosti od geografskog regiona. U istraživanjima su mutacije LRRK2 nađene u širokom rasponu od 0% do čak 15% bolesnika

sa PB, i to uglavnom kod pacijenata sa tipičnom bolešću kasnog početka (12, 13). Opisane su različite varijante gena LRRK2, a prema literaturi najčešća mutacija je zamena guanina adeninom (14) na položaju 6055 u kodirajućoj sekvenci (c.6055G>A). Ova mutacija dovodi do zamene glicina serinom na poziciji 2019 u proteinu (p.Gly2019Ser), u okviru kinaznog domena. RefSNP kataloški broj sekvence navedene mutacije je rs34637584.

Ovo istraživanje je sprovedeno sa ciljem da se utvrdi učestalost mutacije c.6055G>A (rs34637584) u genu LRRK2 u grupi bolesnika sa PB iz Srbije.

Materijal i metode

Istraživanje je sprovedeno u grupi od 127 bolesnika sa PB koji su lečeni na Klinici za neurologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije (UKCS) u periodu od 2015. do 2019. godine. Među bolesnicima je odnos muškog i ženskog pola bio 3:2. Svi bolesnici su registrovani pod dijagnozom PB u kompjuterskoj bazi podataka INFOMEDIS. Za postavljanje dijagnoze bolesti su korišćeni kriterijumi Britanske banke mozгова (1). Kontrolna grupa ispitanika obuhvatala je 280 osoba bez neurodegenerativnih bolesti, a struktura je bila odgovarajuća grupi sa PB u odnosu na pol i životnu dob. Eksperimentalni deo istraživanja je sproveden na Institutu za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Svi učesnici u istraživanju su nakon detaljnog upoznavanja sa ciljevima istraživanja potpisali informisani pristanak o učešću u studiji. Na osnovu odluke broj: 2953/1 ovo istraživanje je odobreno od strane Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

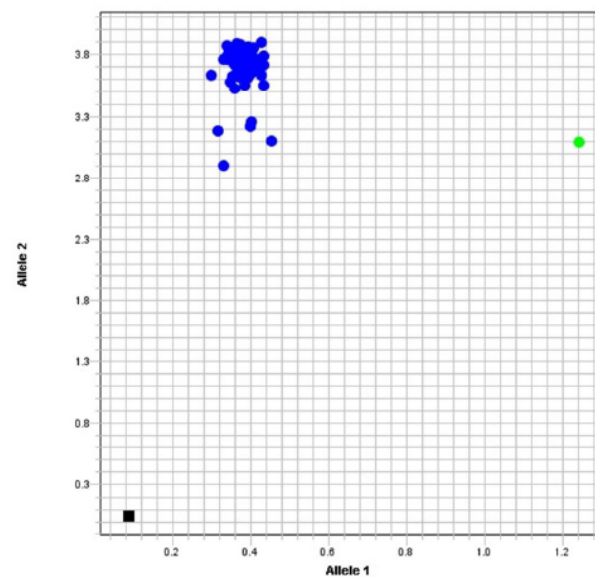
Za potrebe molekularno-genetičke analize prikupljeni su uzorci od 5 ml periferne krvi ispitanika, odakle je potom izolovana DNK. Izolacija DNK vršena je upotrebom komercijalnog kita QIAamp DNA mini-kit (QIAGEN, Nemačka). Za ciljanu detekciju mutacije LRRK2 c.6055G>A (rs34637584) korišćena je metoda polimerazne lančane reakcije u realnom vremenu (engl. Real time PCR), uz upotrebu komercijalnog TaqMan seta reagensa za genotipizaciju (Applied Biosystems, Foster City, SAD). U TaqMan eseju se nalaze prajmeri koji ograničavaju lokus rs34637584 i dve oligonukleotidne probe, svaka specifična za određeni alel. Probe su obeležene različitim fluoroforima: VIC (za alel A) i FAM (za alel G). U toku PCR reakcije DNK polimeraza, zahvaljujući svojoj egzozonukleaznoj aktivnosti, razgrađuje probu, što dovodi do fluorescencije. Signal samo jedne fluorescentne boje u uzorku govori o homozigotnoj konstituciji za odgovarajući alel, dok je signal dve boje podjednakog intenziteta karakterističan za heterozigotni uzorak. Reakciona smeša se sastojala od 7,50 µl TaqMan RT-PCR master mix 2x, 0,75 µl primer and probe mix 20x, 2,25 µl DNK i do 15,00 µl dH₂O. Analiza je izvođena na aparatu ABI 7500 RT PCR System (Applied Biosystems, SAD), a signali su obrađeni pomoću programa 7500 Software (Applied Biosystems, SAD).

Rezultati

Grupu ispitanika sa PB činila su 127 bolesnika, sa odnosom muškog i ženskog pola 3:2. Prosečna životna dob na početku bolesti je bila 52,8 (±11,1) godina, a kretala se u rasponu od 17 do 79 godina. Prisustvo PB u porodici je utvrđeno kod 20% (25/127) bolesnika. Kontrolnu grupu je činilo 280 neurološki zdravih osoba.

Genotip GA na lokusu rs34637584 je utvrđen kod 1 od 127 bolesnika sa PB. Ovakav nalaz odgovara heterozigotnoj mutaciji LRRK2 c.6055G>A (p.Gly2019Ser). Preostalih 126 bolesnika je imalo homozigotni genotip GG, što znači da kod njih nije utvrđena analizirana mutacija. U kontrolnoj grupi zdravih osoba genotip GG je nađen kod svih ispitanika (280/280), odnosno ustanovljeno je odsustvo analizirane LRRK2 mutacije. Ovi rezultati ukazuju da učestalost mutacije LRRK2 c.6055G>A iznosi 0,7% u grupi bolesnika sa PB, odnosno 0% u kontrolnoj grupi zdravih osoba.

U pogledu korelacije sa fenotipom, mutacija LRRK2 c.6055G>A je utvrđena kod bolesnice sa kasnim početkom bolesti i bez jasne familijarne anamneze za PB. Prikaz rezultata genotipizacije analiziranog LRRK2 lokusa posle obrade pomoću 7500 Software dat je na **grafikonu 1**.



Grafikon 1. Prikaz rezultata genotipizacije analiziranog LRRK2 lokusa. Heterozigot za mutaciju uočava se u gornjem desnom uglu (zeleno).

Legenda: Homozigot G/G (plavo); Heterozigot A/G (zeleno)

Diskusija

Gen LRRK2 (PARK8) ima potvrđenu ulogu u nastanku PB. Mutacije LRRK2 gena su dominantne po svom karakteru i sreću se u različitim regionima gena (15). Najrasprostranjenija dokazana patogena mutacija u LRRK2 genu je c.6055G>A (rs34637584). Ova mutacija se nalazi u egzonu 41 gena i u proteinu uslovljava zamenu glicina serinom na položaju 2019 (p.Gly2019Ser) (12-14). Funkcionalno, ona pogađa kinazni domen proteina i dovodi do njegove pojačane aktivnosti (12, 13). U našoj

studiji ova mutacija je detektovana kod jednog od ukupno 127 (0,7%) bolesnika sa PB, i to u heterozigotnoj formi, dok nije nađena u kontrolnoj grupi.

Prema publikovanim podacima iz međunarodnih multicentričnih studija, učestalost ove mutacije iznosi 1% među sporadičnim i 4% među familijarnim slučajevima PB, što odgovara i našim rezultatima. Utvrđeno je da je ova promena najzastupljenija kod Aškenazi Jevreja i severnoafričkih Arapa, gde se njena frekvencija u populaciji sa PB kreće i do 40% (16-18). U populacijama Južne Evrope, pre svega u Španiji, Portugaliji i Italiji, učestalost ove mutacije je veća od proseka, dok je, suprotno tome, ona veoma retka u Severnoj Evropi, Južnoj Africi i Aziji (12, 13, 19). Postavlja se pitanje da li svi nosioci analizirane LRRK2 mutacije obolevaju od PB, tj. da li ona ima potpunu penetrantnost. Procene penetrantnosti variraju u širokom rasponu i kreću se od 25 do 100%, do 80. godine života (20, 21).

Što se tiče kliničkog fenotipa, mutacija LRRK2 c.6055G>A je uglavnom udružena sa tipičnom PB koja pokazuje dobar odgovor na L-dopu, kao što je slučaj i u našem istraživanju. Postoje podaci da nosioci ove mutacije češće imaju posturalnu nestabilnost i poteškoće sa hodom, dok s druge strane imaju manje nemotoričkih manifestacija nego pacijenti bez mutacije (14, 22, 23). U obimnoj studiji opisana je bolja očuvanost pažnje, izvršnih funkcija i govora kod pacijenata sa mutacijom u poređenju sa bolesnicima sa idiopatskom PB.

Mutacija LRRK2 c.6055G>A, kao i većina drugih LRRK2 mutacija, udružena je sa povećanom kinaznom aktivnošću proteina. Stoga se inhibitori LRRK2 kinaze smatraju za potencijalne nove lekove u terapiji PB i njihovo dejstvo se već ispituje, pre svega kod genetički potvrđenih slučajeva (10).

Zaključak

Na osnovu navedenih rezultata, testiranje mutacije c.6055G>A tj. rs34637584 trebalo bi nastaviti na većoj grupi pacijenata i, ukoliko se učestalost potvrdi, preporučilo bi se uvođenje u standardni protokol genetičke analize PB. Utvrđeno je da su mutacije LRRK2 povezane sa odumiranjem dopaminergičkih neurona, a buduće studije treba da bolje objasne specifičnosti njihove ekspresije kod PB. Rasvetljavanje patofizioloških mehanizama u kojima učestvuje LRRK2, kao i njegovih mogućih interakcija sa drugim genima i proteinima značajnim za nastanak i razvoj PB, daju osnovu da se razmotre novi pravci antiparkinsonske terapije. Svakako je jedan od puteva i razvoj personalizovane terapije za nosioce određenih mutacija, a LRRK2 mutacije su u tom pogledu, zbog svoje relativne učestalosti i molekularne prirode, dobri kandidati za takav terapijski pristup.

Literatura

- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. A clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1992; 55(3):181-4.
- Bonifati V. LRRK2 low-penetrance mutations (Gly2019Ser) and risk alleles (Gly2385Arg)-Linking Familial and Sporadic Parkinson's Disease. *Neurochem Res*. 2007; 32(10):1700-8.
- Delamarre A, Meissner WG. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. *Presse Med*. 2017; 46(2):175-81.
- Berg D, Schweitzer KJ, Leitner P, Zimprich A, Lichtner P, Belcredi P, et al. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease. *Brain*. 2005; 128(12):3000-11.
- Paisán-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004; 44(4):595-600.
- Bialecka M, Hui S, Klodowska-Duda G, Opala G, Tan EK, Drodzlik M. Analysis of LRRK2 G2019S and I2020T mutations in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2005; 390(1):1-3.
- Xiong Y, Dawson TM, Dawson VL. Models of LRRK2 associated Parkinson's disease. *Adv Neurobiol*. 2017; 14:163-91.
- Kluss JH, Mamais A, Cookson MR. LRRK2 links genetic and sporadic Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans*. 2019; 47(2):651-61.
- Ramírez BM, Madero-Perez J, Rivero-Rios P, Martínez-Salvador M, Ordonez AJL, Fernandez B, et al. LRRK2 and Parkinson's Disease: From Lack of Structure to Gain of Function. *Curr Protein Pept Sci*. 2017; 18(7):677-86.
- Tolosa E, Vila M, Klein C, Rascol O. LRRK2 in Parkinson disease: challenges of clinical trials. *Nat Rev Neurol*. 2020; 16(2):97-107.
- Chan SL, Tan E. Targeting LRRK2 in Parkinson's disease: an update on recent developments. *Expert Opin Ther Targets*. 2017; 21(6):601-10.
- Biskup S, Moore DJ, Celsi F, Higashi S, West AB, Andrabi SA, et al. Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann Neurol*. 2006; 60(5): 557-69.
- Skibinski G, Nakamura K, Cookson MR, Finkbeiner S. Mutant LRRK2 toxicity in neurons depends on LRRK2 levels and synuclein but not kinase activity or inclusion bodies. *J Neurosci*. 2014; 34(2): 418-33.
- Benson DL, Matikainen-Ankney BA, Hussein A, Huntley GW. Functional and behavioral consequences of Parkinson's disease-associated LRRK2-G2019S mutation. *Biochem Soc Trans*. 2018; 46(6):1697-705.
- Aasly JO, Vilarino-Guell C, Dachsel JC, Webber PJ, West AB, Haugarvoll K, et al. Novel pathogenic LRRK2 p.Asn1437His substitution in familial Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2010; 25(13):2156-63.
- Bar-Shira A, Hutter CM, Giladi N, Zabetian CP, Orr-Urtreger A. Ashkenazi Parkinson's disease patients with the LRRK2 G2019S mutation share a common founder dating from the second to fifth centuries. *Neurogenetics*. 2009; 10(4):355-358.
- Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, Ohmann E, Deligtisch A, Tagliati M, et al. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 2006; 354(4):424-5.
- Lesage S, Condroyer C, Lannuzel A, Lohmann E, Troiano A, Tison F, et al. Molecular analyses of the LRRK2 gene in European and North African autosomal dominant Parkinson's disease. *J Med Genet*. 2009; 46(7): 458-64.
- Shojaee S, Sina F, Farboodi N, Fazlali Z, Ghazavi F, Ghorashi SA, et al. A clinic-based screening of mutations in exons 31, 34, 35, 41, and 48 of LRRK2 in Iranian Parkinson's disease patients. *Mov Disord*. 2009; 24(7): 1023-27.

20. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, et al; International LRRK2 Consortium. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* 2008; 7(7):583-90.
21. Marder K, Wang Y, Alcalay RN, Mejia-Santana H, Tang MX, Lee A, et al; LRRK2 Ashkenazi Jewish Consortium. Age-specific penetrance of LRRK2 G2019S in the Michael J. Fox Ashkenazi Jewish LRRK2 Consortium. *Neurology.* 2015; 85(1):89-95.
22. Alcalay RN, Mejia-Santana H, Tang MX, Rosado L, Verbitsky M, Kisselev S, et al. Motor phenotype of LRRK2 G2019S carriers in early-onset Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2009; 66(12):1517-22.
23. Kim CY, Alcalay RN. Genetic Forms of Parkinson's Disease. *Semin Neurol.* 2017; 37(2):135-46.