

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Milena Z. Janković

**STUDIJA GENETIČKE OSNOVE  
PARKINSONOVE BOLESTI  
KOD STANOVNIŠTVA SRBIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Milena Z. Jankovic

**STUDY OF THE GENETIC BASIS OF  
PARKINSON'S DISEASE  
IN SERBIAN POPULATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

MENTORI:

Akademik prof. dr. Vladimir Kostić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

prof. dr Marija Guć-Šćekić, redovni profesor u penziji,  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

prof. dr Ivana Novaković, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Medicinski Fakultet

prof. dr Dragana Cvetković, vanredni profesor,  
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

DATUM ODBRANE:

DATUM PROMOCIJE:

*Želim da izrazim zahvalnost svim dragim ljudima bez kojih izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća.*

*Akademiku prof. dr Vladimiru Kostiću se neizmerno zahvaljujem na pruženoj jedinstvenoj prilici da budem deo vrhunskog istraživačkog tima i privilegiji da prve korake u svet neurogenetike načinim uz brižnu podršku vrsnog naučnika i učitelja.*

*Profesorki dr Mariji Guć-Šćekić se zahvaljujem na prenetom velikom znanju i iskustvu u oblasti medicinske genetike i na entuzijazmu i podršci tokom izrade doktorske teze.*

*Profesorki dr Ivani Novaković se zahvaljujem na inspiraciji, beskrajnom razumevanju i strpljenju, dragocenim savetima u izradi i pisanju teze, kao i na prenetom bogatom naučnom iskustvu i podsticanju istraživačkog duha.*

*Profesorki dr Dragani Cvetković se zahvaljujem na predanom i analitičkom pristupu tezi, veoma korisnim konsultacijama i sugestijama koje su značajno doprinele kvalitetu disertacije.*

*Koleginici dr Valeriji Dobričić se zahvaljujem na bezrezervnoj podršci i prijateljstvu, na svemu što me je tokom proteklih pet godina nesebično naučila i što je neiscrpnom energijom i vedrim duhom istraživački rad učinila još zanimljivijim.*

*Profesorki dr Tatjani Pekmezović se zahvaljujem na pomoći u analizi rezultata i na uvođenju u izazovni svet statistike.*

*Dr Ani Westenberger se zahvaljujem na pružanju smernica i savetima u rešavanju nedoumica i izazova tokom istraživanja.*

*Kolegicama Vesni Ralić, Mileni Žarković i Ani Marjanović se zahvaljujem na angažovanju u laboratorijskom izvođenju istraživanja.*

*Zahvaljujem se svim kolegama sa Klinike za neurologiju KCS, koji su svojim predanim istraživačkim radom značajno doprineli celovitosti ovog istraživanja.*

*Mojoj porodici i Vladi hvala na motivaciji, podršci i osloncu.*

*Posvećeno Gagi*

# STUDIJA GENETIČKE OSNOVE PARKINSONOVE BOLESTI KOD STANOVNIŠTVA SRBIJE

## REZIME

### *Uvod:*

Parkinsonova bolest je drugo najčešće neurodegenerativno oboljenje koje pogađa od 1% do 2% stanovništva starijeg od 65 godina i više od 4% stanovništva starijeg od 85 godina. Klinička prezentacija obuhvata četiri kardinalna znaka bolesti: bradikineziju, tremor u miru, rigor i posturalnu nestabilnost, kao i druge motorne i nemotorne simptome. Parkinsonova bolest se karakteriše kao multifaktorijalno oboljenje u čijem nastanku najverovatniju ulogu ima interakcija genetičkih i sredinskih faktora. Genetička osnova je veoma kompleksna i do danas je otkriveno preko 28 hromozomskih regiona koji su sa većom ili manjom sigurnošću povezani sa nastankom bolesti. Uzrok autozomno-dominantne forme bolesti najčešće su mutacije u *LRRK2* genu, dok je *VPS35* najskorije potvrđen gen, asociiran sa ovakvim načinom nasleđivanja. Kod autozomno-recesivne forme su najčešće mutacije u *Parkin* genu, a najznačajniji faktor rizika za razvoj Parkinsonove bolesti su mutacije u *GBA* genu koje dovode do autozomno-recesivnog oboljenja, Gošeove bolesti.

### *Cilj:*

Cilj ovog istraživanja je karakterizacija genetičke osnove Parkinsonove bolesti kod stanovništva Srbije i formiranje preporuka za genetičko testiranje bolesnika. U tom cilju je vršeno određivanje učestalosti i spektra mutacija kod obolelih od Parkinsonove bolesti u genima *LRRK2*, *Parkin*, *VPS35* i *GBA*, kao i utvrđivanje potencijalnih korelacija genotipa sa fenotipom.

### *Materijal i metode:*

U ovo istraživanje je uključeno ukupno 496 bolesnika (305 muškog i 191 ženskog pola) kojima je klinička dijagnoza Parkinsonove bolesti postavljena na Klinici za neurologiju, Kliničkog centra Srbije. Svi bolesnici su testirani na prisustvo mutacija u odabranim regionima *LRRK2* i *VPS35* gena metodom direktnog sekvenciranja. Detektovane promene

koje do sada nisu opisane u literaturi su analizirane i kod 143 kontrolnih, neurološki zdravih subjekata, starijih od 50 godina. U subgrupi od 225 bolesnika sa ranim početkom bolesti i/ili pozitivnom porodičnom anamnezom je vršena sveobuhvatna analiza *Parkin* gena direktnim sekvenciranjem i MLPA metodom. Analiza odabranih regiona *GBA* gena direktnim sekvenciranjem je primenjena kod 481 bolesnika, 15 srodnika obolelih od Gošeeve bolesti i 348 zdravih kontrola. Potencijalna patogenost do sada neopisanih mutacija je testirana *in silico* analizom primenom dostupnih predikcionih softvera.

### **Rezultati i diskusija:**

U kodirajućim sekvencama *LRRK2* gena su detektovane četiri različite mutacije (c.6055G>A, c.4111A>G, c.4522A>G i c.5971A>G) kod četiri nesrodna bolesnika. Dve mutacije, c.4522A>G i c.5971A>G, nisu do sada opisane u literaturi i nisu detektovane kod 286 kontrolnih hromozoma. Detektovana je i jedna promena koja potencijalno utiče na mesto iskrajanja egzona, c.4536+3A>G, kod dva nesrodna bolesnika, ali je ova promena detektovana i kod 3 kontrolna ispitanika. Klinička prezentacija nosilaca mutacija u *LRRK2* genu se nije značajno razlikovala u odnosu na bolesnike bez mutacija. Jedino je odnos polova bio značajno drugačiji u odnosu na čitavu ispitivanu grupu bolesnika.

Analizom *VPS35* gena nije detektovana jedina do sada opisana patogena mutacija (c.1858G>A) ni kod jednog od testiranih bolesnika. Takođe, u sekvenciranom egzonu 15 nije detektovana ni jedna promena sekvence, kao ni u egzon-intron granicama obuhvaćenim analizom.

U *Parkin* genu je direktnim sekvenciranjem detektovano 13 različitih promena, od čega se 8 može smatrati patogenim (c.101\_102delAG, c.167T>A, c.245C>A, c.398\_399insACC, c.758G>A, c.823C>T, c.1180G>A i c.1310C>T), dok su MLPA metodom detektovane promene kod 6 bolesnika (delecija egzona 2, delecija egzona 2-3, duplikacija egzona 3, duplikacija egzona 4, duplikacija egzona 4-7, duplikacija egzona 5-7, kao i triplikacija egzona 3). Kod ukupno četiri bolesnika koji su bili složeni heterozigoti zapažene su ranije godine početka bolesti u odnosu na testirane bolesnike bez mutacije, dok kod osam bolesnika koji su bili heterozigotni nosioci mutacija ovakav trend nije primećen.

Selektivnom analizom *GBA* gena, detektovano je ukupno 58 heterozigotnih promena kod bolesnika sa Parkinsonovom bolešću, 3 složenih heterozigotnih i 1 homozigotna promena

kod bolesnika sa Parkinsonovom i Gošeovom bolešću, 12 heterozigotnih promena kod srodnika bolesnika sa Gošeovom bolešću i 17 heterozigotnih promena u grupi kontrola. Detektovane su sledeće promene pojedinačnog nukleotida: c.1103G>A, c.1223C>T, c.1226A>G, c.1256A>T, c.1289C>T, c.1292A>G, c.1342G>C, c.1448T>C, c.1504C>T i c.1505G>A, kao i tri kompleksna rekombinantna alela: RecΔ5 (c.1263–1317del55), [D409H;H255Q] (c.1342G>C, c.882T>G) i RecNcil (c.1448T>C, c.1483G>C, c.1497G>C). Učestalost mutacija u *GBA* genu je značajno veća kod bolesnika sa PB u odnosu na učestalost u kontrolnoj grupi. Klinička prezentacija bolesti kod nosilaca mutacije u *GBA* genu se u većini simptoma nije razlikovala od sporadične Parkinsonove bolesti, osim što je veći broj nosilaca mutacije imao bol kao inicijalni simptom.

#### ***Zaključak:***

U ovom istraživanju su utvrđene učestalosti i spektar mutacija u analiziranim genima i korelacije genotipa sa fenotipom bolesnika, koje su bile u korelaciji sa dostupnim podacima iz literature. Na osnovu dobijenih rezultata su formirane preporuke za protokol dijagnostičkog genetičkog testiranja. Genetičke analize *LRRK2*, *VPS35*, *Parkin* i *GBA* gena su uvedene u rutinsku kliničku dijagnostiku Parkinsonove bolesti. Tokom ovog istraživanja oformljena je banka uzoraka krvi i DNK bolesnika sa Parkinsonovom bolešću, koja trenutno obuhvata više od 500 uzoraka.

#### ***Ključne reči:***

Parkinsonova bolest, *PARK2*, *LRRK2*, *VPS35*, *GBA*, učestalost mutacija, Srbija, genetičko testiranje, direktno sekvenciranje, MLPA

**Naučna oblast: Biologija**

**Uža naučna oblast: Medicinska genetika**

**UDK: [575.22:224.2]:616.858(043.3)**

# STUDY OF THE GENETIC BASIS OF PARKINSON'S DISEASE IN SERBIAN POPULATION

## ABSTRACT

### ***Background:***

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disorder that affects 1% to 2% of the population older than 65 years and over 4% of the population older than 85 years. Clinical presentation includes four cardinal signs of disease: bradykinesia, resting tremor, rigidity and postural instability, as well as other motor and non-motor symptoms. Parkinson's disease is characterized as a multifactorial disorder with probable interaction of genetic and environmental factors. The genetic basis is very complex and more than 28 chromosomal regions, associated with the disease, are discovered so far. Mutations in the *LRRK2* gene are the most common cause of autosomal dominant Parkinson's disease, while the mutations in *VPS35* gene are recently discovered as a new cause of dominantly inherited form of the disease. Autosomal recessive Parkinson's disease is the most frequently linked to mutations in the *Parkin* gene. The strong risk factor for the development of Parkinson's disease are heterozygous mutations in the *GBA* gene. Homozygous and compound heterozygous mutations in *GBA* gene are cause of autosomal recessive Gaucher's disease.

### ***Aim:***

The aim of this study was to determine genetic basis of Parkinson's disease in Serbian population and to establish recommendations for genetic testing of patients with this disorder. It was planned to determine the frequency of mutations and the mutation spectrum in *LRRK2*, *Parkin*, *VPS35* and *GBA* genes in Serbian patients with Parkinson's disease and to examine correlations of genotype and phenotype.

### ***Material and methods:***

In this study were included 496 patients with Parkinson's disease (305 male and 196 female) diagnosed in Neurology Clinic, Clinical Center of Serbia. The presence of



mutations in selected exons of *LRRK2* and *VPS35* genes was analyzed by direct sequencing. Detected variants which are not described in the literature yet are analyzed in 143 healthy controls older than 50 years. In subgroup of 225 patients with early onset of the disease and/or positive family history of Parkinson's disease analysis included direct sequencing of all coding regions of *Parkin* gene and duplication and deletion detection using MLPA method. Analysis of selected exons of the *GBA* gene was performed in 481 patients with Parkinson's disease, 15 relatives of patients with Gaucher's disease and 348 healthy controls. Potential pathogenicity of novel variants was tested *in silico* using available prediction softwares.

### ***Results and discussion:***

Four different mutations (c.6055G>A, c.4111A>G, c.4522A>G and c.5971A>G) were detected in coding regions of *LRRK2* gene in four unrelated patients. Mutations c.4522A>G and c.5971A>G were not described in the literature yet and they were not detected in 286 control chromosomes. One detected intronic variant c.4536+3A>G, that is potentially affecting splicing, was detected in two unrelated patients and in 3 controls. Clinical presentations of the disease in mutation carriers were not different compared to non-carriers. Only the sex ratio was significantly different compared to the entire study group of patients.

The proven pathogenic mutation c.1858G>A in *VPS35* gene was not detected in tested patients. Also, analysis of exon 15 and exon-intron borders of *VPS35* gene did not revealed any sequence change.

In *Parkin* gene was detected 13 different variants by direct sequencing. Eight of these changes can be considered as pathogenic (c.101\_102delAG, c.167T>A, c.245C>A, c.398\_399insACC, c.758G>A, c.823C>T, c.1180G>A i c.1310C>T). MLPA method revealed dosage changes in six patients (exon 2 deletion, exons 2-3 deletion, exon 3 duplication and triplication, exon 4 duplication, exons 4-7 duplications and exons 5-7 duplications). Four patients with homozygous or compound heterozygous mutations had earlier onset of the disease compared to non-carriers or heterozygotes.

In selected exons of the *GBA* gene was detected 58 heterozygotes in patients with Parkinson's disease, three compound heterozygotes and one homozygote in patients with

Parkinson's and Gaucher's disease, 12 heterozygotes in relatives of patients with Gaucher's disease, and 17 heterozygotes among healthy controls. Single nucleotide changes were: c.1103G>A, c.1223C>T, c.1226A>G, c.1256A>T, c.1289C>T, c.1292A>G, c.1342G>C, c.1448T>C, c.1504C>T i c.1505G>A, and complex, recombinant alleles were RecΔ5 (c.1263–1317del55), [D409H;H255Q] (c.1342G>C, c.882T>G) i RecNcil (c.1448T>C, c.1483G>C, c.1497G>C). Mutation frequency in *GBA* gene was higher in patients with Parkinson's disease compared to controls. Clinical presentations of the disease in mutation carriers were not different compared to non-carriers, except pain that was frequently presenting symptom in mutation carriers.

**Conclusion:**

Mutation frequencies and spectrum in analyzed genes and genotype-phenotype correlations in patients with Parkinson's disease were in accordance with available data from the literature. Based on the obtained results, recommendations for diagnostic genetic testing were proposed. Genetic analysis of *LRRK2*, *VPS35*, *Parkin* and *GBA* genes were introduced into routine clinical diagnosis of Parkinson's disease. During this research, a bank of blood and DNA samples of patients with Parkinson's disease has been established, which currently includes more than 500 samples.

**Key words:** Parkinson's disease, *PARK2*, *LRRK2*, *VPS35*, *GBA*, mutation frequency, Serbia, genetic testing, direct sequencing, MLPA

**Academic Expertise: Biology**

**Field of Academic Expertise: Medical Genetics**

**UDK number: [575.22:224.2]:616.858(043.3)**

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Istorijski aspekt Parkinsonove bolesti .....	2
1.2. Klinički aspekt i terapija Parkinsonove bolesti .....	4
1.2.1. Motorni simptomi .....	5
1.2.2. Nemotorni simptomi .....	6
1.2.3. Terapija Parkinsonove bolesti .....	7
1.3. Etiologija Parkinsonove bolesti .....	8
1.4. Genetička osnova Parkinsonove bolesti .....	10
1.4.1. Klasifikacija genetičkih formi Parkinsonove bolesti .....	10
1.4.2. Autozomno-dominantne forme Parkinsonove bolesti .....	12
1.4.2.1. <i>PARK8 / LRRK2</i> gen .....	13
Pozicija i struktura <i>LRRK2</i> gena .....	14
Mutacije u <i>LRRK2</i> genu .....	15
Ekspresija i funkcija <i>LRRK2</i> gena .....	17
1.4.2.2. <i>PARK17 / VPS35</i> gen .....	19
Pozicija i struktura <i>VPS35</i> gena .....	19
Mutacije u <i>VPS35</i> genu .....	19
Ekspresija i funkcija <i>VPS35</i> gena .....	21
1.4.2.3. Ostale forme autozomno-dominantne Parkinsonove bolesti .....	22
<i>PARK1 (PARK4) / SNCA</i> gen .....	22
<i>PARK18 / EIF4G1</i> gen .....	22
1.4.3. Autozomno-recesivne forme Parkinsonove bolesti ranog početka .....	23
1.4.3.1. <i>PARK2/Parkin</i> .....	24
Pozicija i struktura <i>Parkin</i> gena .....	24
Mutacije u <i>Parkin</i> genu .....	24
Ekspresija i funkcija <i>Parkin</i> gena .....	26
1.4.3.2. Ostale forme autozomno-recesivne Parkinsonove bolesti .....	29
<i>PARK6 / PINK1</i> gen .....	29
<i>PARK7 / DJ-1</i> gen .....	30
1.4.4. Autozomno-recesivne forme atipičnih parkinsonizama .....	31
1.4.5. Genetički faktori rizika .....	33
1.4.5.1. <i>GBA</i> gen .....	34
Pozicija i struktura <i>GBA</i> gena .....	34
Mutacije u <i>GBA</i> genu .....	35
Ekspresija i funkcija <i>GBA</i> gena .....	37
1.5. Patogeneza Parkinsonove bolesti .....	37

1.5.1. Ubikvitin-proteazomni sistem (UPS) razgradnje u Parkinsonovoj bolesti .....	38
1.5.2. Lizozomno-zavisni putevi razgradnje u Parkinsonovoj bolesti .....	39
1.6. Nove strategije istraživanja u genetici PB .....	41
<b>2. CILJEVI RADA .....</b>	<b>44</b>
<b>3. BOLESNICI I METODE .....</b>	<b>46</b>
3.1. Ispitanici .....	47
3.1.1. Bolesnici i članovi porodica .....	47
3.1.2. Kontrole .....	48
3.2. Metode .....	48
3.2.1. Izolacija genomske DNK .....	49
3.2.1.1. Protokol za brzu izolaciju genomske DNK komercijalnim kitovima .....	49
3.2.1.2. Protokol za izolaciju genomske DNK metodom isoljavanja .....	51
3.2.2. Određivanje koncentracije ukupne DNK .....	51
3.2.2.1. Protokol za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNK .....	52
3.2.3. Detekcija tačkastih mutacija i malih insercija i delecija .....	52
3.2.3.1. Amplifikacija DNK regiona od interesa .....	53
Sekvence oligonukleotidnih prajmera za PCR amplifikaciju .....	53
Priprema PCR reakcije .....	56
Protokoli za izvođenje PCR amplifikacije .....	58
3.2.3.2. Provera PCR amplifikacije .....	61
Protokol za pripremu i izvođenje agarozne gel elektroforeze .....	62
3.2.3.3. Prečišćavanje PCR produkta .....	63
Protokol za prečišćavanje PCR produkata .....	63
3.2.3.4. Direktno sekvenciranje .....	63
Priprema i izvođenje reakcije sekvenciranja .....	64
Prečišćavanje produkata reakcije sekvenciranja .....	66
3.2.3.5. Kapilarna elektroforeza .....	68
3.2.3.6. Analiza sekvenci .....	69
3.2.3.7. <i>In silico</i> analiza .....	70
3.2.4. Detekcija velikih duplikacija i delecija .....	71
3.2.4.1. Komponente SALSA MLPA kitova .....	73
3.2.4.2. Protokol za izvođenje MLPA reakcije .....	74
3.2.4.3. Kapilarna elektroforeza .....	76

3.2.4.4. Analiza rezultata .....	77
3.2.5. Statistička analiza .....	78
4. REZULTATI .....	79
4.1. Analiza autozomno-dominantne Parkinsonove bolesti: <i>PARK8/LRRK2</i> .....	80
4.1.1. Demografska i klinička karakterizacija ispitanika .....	80
4.1.2. Distribucija promena u sekvenci <i>LRRK2</i> gena .....	81
4.1.3. Fenotipske karakteristike nosilaca <i>LRRK2</i> mutacija .....	86
4.2. Analiza autozomno-dominantne Parkinsonove bolesti: <i>PARK17/VPS35</i> ....	87
4.2.1. Demografska i klinička karakterizacija ispitanika .....	87
4.2.2. Distribucija promena u sekvenci <i>VPS35</i> gena .....	88
4.3. Analiza autozomno-recesivne Parkinsonove bolesti: <i>PARK2/Parkin</i> .....	88
4.3.1. Demografska i klinička karakterizacija ispitanika .....	88
4.3.2. Distribucija promena u sekvenci <i>Parkin</i> gena .....	89
4.3.3. Distribucija promena u broju kopija <i>Parkin</i> gena .....	97
4.3.4. Fenotipske karakteristike nosilaca <i>Parkin</i> mutacija .....	100
4.4. Analiza <i>GBA</i> gena .....	103
4.4.1. Demografska i klinička karakterizacija ispitanika .....	103
4.4.2. Distribucija promena u sekvenci <i>GBA</i> gena .....	104
4.4.3. Fenotipske karakteristike nosilaca <i>GBA</i> mutacija .....	111
5. DISKUSIJA .....	113
5.1. Analiza sekvence <i>LRRK2</i> gena .....	114
5.1.1. Distribucija promena u kodirajućim regionima <i>LRRK2</i> gena .....	114
5.1.2. Distribucija promena u nekodirajućim regionima <i>LRRK2</i> gena .....	117
5.1.3. <i>LRRK2</i> gen: Korelacije genotipa sa fenotipom .....	118
5.1.4. Preporuke za dijagnostičko genetičko testiranje <i>LRRK2</i> gena .....	121
5.2. Analiza sekvence <i>VPS35</i> gena .....	122
5.2.1. Preporuke za dijagnostičko genetičko testiranje <i>VPS35</i> gena .....	123
5.3. Analiza sekvence <i>Parkin</i> gena .....	123
5.3.1. Distribucija promena u sekvenci kodirajućih regiona <i>Parkin</i> gena ....	124
5.3.2. Distribucija promena u broju kopija kodirajućih regiona <i>Parkin</i> gena	127
5.3.3. Distribucija promena u sekvenci nekodirajućih regiona <i>Parkin</i> gena	128
5.3.4. <i>Parkin</i> gen: Korelacije genotipa sa fenotipom .....	129
5.3.4.1. Homozigotni i složeni heterozigotni nosioci mutacija u <i>Parkin</i> genu .....	129
5.3.4.2. Heterozigotni nosioci mutacija u <i>Parkin</i> genu .....	130
5.3.5. Preporuke za dijagnostičko genetičko testiranje <i>Parkin</i> gena .....	133
5.4. Analiza sekvence <i>GBA</i> gena .....	133

5.4.1. Distribucija promena u kodirajućim regionima <i>GBA</i> gena .....	134
5.4.2. <i>GBA</i> gen: Korelacije genotipa sa fenotipom .....	139
5.4.3. Preporuke za dijagnostičko genetičko testiranje <i>GBA</i> gena .....	141
6. ZAKLJUČCI .....	143
7. LITERATURA .....	148
8. BIOGRAFIJA AUTORA .....	193
Прилог 1. Изјава о ауторству .....	195
Прилог 2. Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада .....	196
Прилог 3. Изјава о коришћењу .....	197

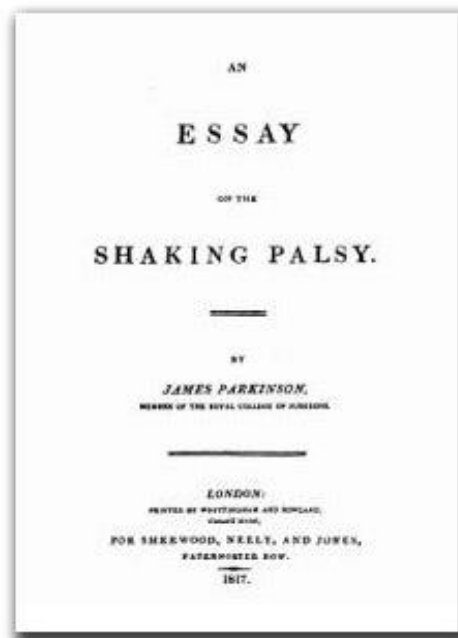
## ***1. Uvod***

# 1. UVOD

Parkinsonova bolest (PB) je drugo po učestalosti neurodegenerativno oboljenje, posle Alchajmerove bolesti, koje se javlja kod 1% do 2% stanovništva starijeg od 65 godina i više od 4% stanovništva starijeg od 85 godina (Lang i Lozano, 1998). Klinička prezentacija uključuje, pre svega, motorne simptome: bradikinezija, tremor u miru, rigor i posturalna nestabilnost, koji predstavljaju četiri kardinalna znaka bolesti, ali danas se i brojne nemotorne manifestacije smatraju delom kliničke slike (Gibb i sar., 1988). Etiologija bolesti nije u potpunosti razjašnjena i najveći broj slučajeva se smatra idiopatskim. Pretpostavlja se da je PB multifaktorijalno oboljenje u čijem nastanku ulogu ima kompleksna interakcija genetičkih i sredinskih faktora. Procenjuje se da oko 20% bolesnika sa PB ima pozitivnu porodičnu istoriju bolesti, iako do sada otkrivene monogenske forme imaju znatno manju učestalost (Klein i Westenberger, 2012).

## 1.1. Istorijski aspekt Parkinsonove bolesti

Bolest je prvi put opisao londonski lekar James Parkinson (1755-1824) u publikaciji *An Essay on the Shaking Palsy* (Slika 1.), predstavljajući novu kliničku sliku sa tremorom u miru, usporenim hodom i motorikom (Parkinson, 1817). Prvi naziv je bio *Paralysis agitans*, sve do 1888. godine kada je čuveni neurolog Jean–Martin Charcot predložio termin Parkinsonova bolest, upravo u čast Jamesa Parkinsona. U tom periodu je opisan i prvi slučaj PB u Srbiji koji je objavio naš čuveni lekar i književnik Laza K. Lazarević 1887. godine u Srpskom arhivu (Kostić, 1998), i to kod bolesnika sa ranim početkom bolesti (pre 42 godine života).

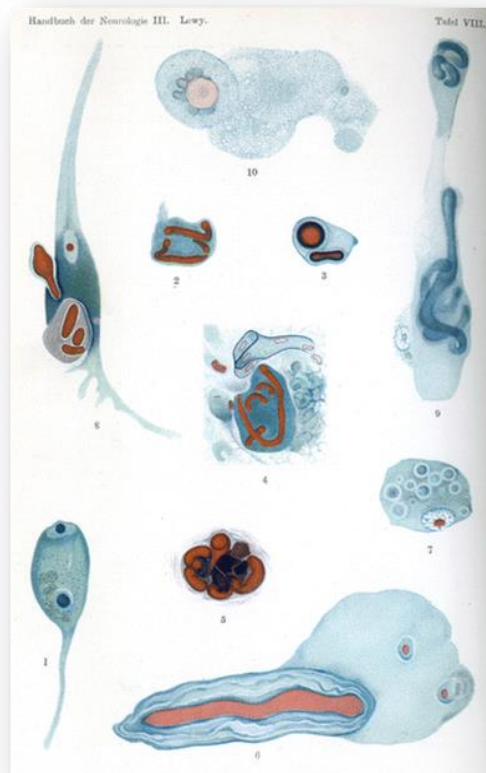


Slika 1. Naslovna strana originalnog rada Jamesa Parkinsona iz 1817. godine. Preuzeto sa [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)



Skoro čitav vek posle prvog opisa PB, 1913. godine Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) je opisao sferične inkluzije u nukleusu „*substantiae innominatae*“ kod bolesnika sa simptomima PB (Lewy, 1913), a pet godina kasnije Konstantin Tretiakoff je pokazao gubitak pigmentovanih neurona u regionu substantije nigre (SN) i potvrdio značaj SN u patologiji PB (Tretiakoff, 1919).

Do otkrića prve potencijalne terapije u PB je došlo gotovo pedeset godina kasnije, 1960. godine, kada je utvrđeno da je koncentracija dopamina znatno snižena u kaudatusu i putamenu kod obolelih od PB. To je dovelo do prve uspešne primene prekursora dopamina (L-Dopa) u lečenju PB (Cotzias i sar., 1967).



Slika 2. Prvi crteži Levijevih tela  
Preuzeto iz Holdorff i sar., 2013.

Krajem prošlog veka u publikacijama se javila dilema da li je PB postojala i u ranijim epohama ili je posledica intenzivne industrijalizacije i zagađenja sa jedne strane i produženja životnog veka sa druge (Stern, 1989; Tanner, 1990). Naime, opisi simptoma koji bi mogli odgovarati PB postoje još zapisima Galena, a kasnije i Leonarda Da Vincija ukazujući da se oboljenje javljalo i znatno pre XIX veka (Stern, 1989).

Istraživanja u oblasti PB su poslednjih decenija najvećim delom usmerena na genetičku osnovu bolesti i rasvetljavanje molekularnih mehanizama koji dovode do nastanka i progresije simptoma. Otkrića u ovim oblastima su dovela do revolucionarnih promena u razumevanju PB i započela razvoj inovativnih teorija o patogenezi bolesti. Prvi podaci o genetičkoj osnovi PB datiraju još iz četrdestih godina XX veka, kada je u velikoj švedskoj porodici opisana bolest u više generacija, sa autozomno-dominantnim obrascem nasleđivanja parkinsonskih simptoma i penetrantnošću od oko 60% (Fuchs i sar., 2007).

Danas je poznato da je uzrok bolesti bila multiplikacija gena za alfa-sinuklein (Fuchs i sar., 2007) i upravo je *SNCA* 1997. godine prvi mapiran gen odgovoran za nastanak monogenske forme PB (Polymeropoulos i sar., 1997). Posle otkrića gena za alfa-sinuklein, ređala su se otkrića novih gena koji se mogu povezati sa nastankom PB. Lokus u kome se nalazi gen za alfa-sinuklein je označen kao *PARK1* i do danas se broj „*PARK*“ lokusa neprestano povećava i mapiraju se novi geni asociirani sa PB (Bonifati, 2014).

Centralnu ulogu u patologiji PB ima agregacija i nemogućnost razgradnje alfa-sinukleina u neuronima i akumulacija u Lewijevim telima, kako kod monogenskih formi bolesti, tako i kod sporadičnih slučajeva (Bendor i sar., 2013). Iako su dostignuća na polju genetike i patofiziologije PB značajno doprinela razumevanju mehanizama patogeneze bolesti, etiologija velikog broja slučajeva je i dalje nerazjašnjena. Nije do kraja jasno ni šta utiče na razlike u prezentaciji bolesti i terapijskom odgovoru.

## **1.2. Klinički aspekt i terapija Parkinsonove bolesti**

Prema najšire korišćenim kriterijumima, predloženim na osnovu neuropatoloških istraživanja u Britanskoj banci mozгова (eng. *UK Parkinsons Disease Society Brain Bank*), za postavljanje dijagnoze potrebno je prisustvo bradikinezije i barem još jednog od preostala 3 znaka – tremora u miru, rigora i posturalne nestabilnosti (Gibb i sar., 1988) i uprkos razvoju brojnih dijagnostičkih metoda, dijagnoza i danas ostaje, pre svega, klinička. PB je progresivno oboljenje koje od blagih, unilateralnih simptoma napreduje do potpune vezanosti za invalidska kolica ili postelju u terminalnim fazama (Hoehn i Yahr, 1967). Početak bolesti se tradicionalno povezuje za sedmom decenijom života, tako da se pod PB ranog početka, prema različitim radovima, smatra pojava prvih motornih simptoma u četrdesetim i pedesetim godinama (Schrag i Schott, 2006).

### 1.2.1. Motorni simptomi

Klinička karakterizacija PB obuhvata već spomenuta četiri kardinalna znaka (Gibb i sar., 1988):

- Bradikinezija predstavlja sporost i osiromašenost voljnih pokreta sa progresivnim smanjenjem brzine i amplitude repetitivnih pokreta. Ovaj simptom se manifestuje mikrografijom, hipomimijom, retkim treptanjem, kao i gubitkom gestikulacije pri govoru.
- Tremor u miru je oblik tremora koji se ispoljava pri punoj relaksaciji ekstremiteta sa frekvencom 4-6Hz. Počinje asimetrično i mnogo češće na rukama nego na nogama. Ovaj simptom nije dovoljan za postavljanje dijagnoze i retko se javlja izolovano.
- Rigor je kontinuirano nepromenjeno povećanje mišićnog tonusa tokom čitavog pokreta koji se može osećati ili ujednačeno ili u vidu fenomena „zupčastog točka“. Manifestuje se distalno (stopala i šake) i proksimalno (vrat, rameni i karlični pojas).
- Posturalna nestabilnost predstavlja poteškoće u održavanju uspravnog položaja, pogotovo prilikom naglih promena pravca kretanja. Javlja se u kasnijoj fazi bolesti i nastaje zbog gubitka posturalnih refleksa. Pojava ovog simptoma na početku bolesti ili u ranoj fazi ukazuje na neki od atipičnih parkinsonizama (progresivnu supranuklearnu paralizu ili multiplu sistemsku atrofiju).

Pored navedenih simptoma čije je postojanje, kao što je već rečeno, neophodno za postavljanje dijagnoze PB, tokom bolesti se javljaju i drugi motorni simptomi koji značajno utiču na kvalitet života bolesnika. Izdvajaju se poremećaji hoda koji se manifestuju smanjenom brzinom hoda, dužim oslanjanjem na obe noge i skraćanjem koraka. Pored toga javljaju se motorni blokovi (eng. *freezing*) u trajanju od oko deset sekundi koji su često uzrok padova. Manifestacije bulbarne disfunkcije, koje se javljaju u odmaklim fazama bolesti, su poremećaj govora (utišan i monoton govor) i disfagija (poremećaj gutanja), koja može dovesti do aspiracione pneumonije i sijaloreje.

## 1.2.2. Nemotorni simptomi

Nemotorni simptomi PB dobijaju sve veći značaj u postavljanju dijagnoze, a takođe bitno utiču na kvalitet života bolesnika. Utvrđeno je da je pri pojavi prvih motornih simptoma neurodegeneracija već u odmakloj fazi, tako da su Braak i saradnici postavili hipotezu o postojanju premotorne faze bolesti u kojoj bi bili ispoljeni neki od nemotornih simptoma (Braak i sar., 2002). S obzirom na to da nemotorni simptomi često postaju glavne tegobe bolesnika, oni predstavljaju i novi terapijski izazov.

Jedan od glavnih ranih nemotornih simptoma je olfaktorna disfunkcija koja se manifestuje oslabljenom detekcijom i identifikacijom mirisa i koji se javlja kod i do 90% obolelih i kao takav je mogući značajan pokazatelj u detekciji bolesnika u premotornoj fazi bolesti (Hawkes i sar., 1997). Bol je jedan od nemotornih simptoma koji se javlja kod 40-50% bolesnika i to najčešće na onom ekstremitetu koji je prvi zahvaćen motornim poremećajima (Snider i sar., 1976; Nègre-Pagès i sar., 2008). Urinarna i seksualna disfunkcija, opstipacija i ortostatska hipotenzija su manifestacije autonomne disfunkcije u PB i svaki od ovih simptoma pogađa više od 30% bolesnika (Magalhães i sar., 1995). Autonomna disfunkcija se javlja u korelaciji sa većom motornom onesposobljenošću, kao i drugim nemotornim simptomima (poremećajem spavanja, kognitivnim padom i psihijatrijskim poremećajima) (Verbaan i sar., 2007). U okviru poremećaja spavanja, koji pogađaju dve trećine obolelih, javlja se nesanica, teško buđenje i osećaj neispavanosti kao i poremećaj sna tokom noći praćen naglim pokretima i sindromom nemirnih nogu (Tandberg i sar., 1998). Tokom dana se javlja prekomerna pospanost i kod nekih bolesnika i iznenadni ataci spavanja (Hobson i sar., 2002). Kognitivne promene, koje su takođe česte u PB i mogu se javiti u ranim fazama bolesti, uključuju oštećenja egzekutivnih funkcija kao što su mogućnost planiranja i organizacije (Weintraub i sar., 2004). Tokom vremena, blagi kognitivni poremećaj se može razviti u demenciju. Učestalost demencije kod bolesnika sa PB je između 20% i 40%, a kao faktori rizika se ističu godine starosti i težina bolesti (Marder, 2010). Među psihijatrijskim simptomima treba istaći anksioznost i promene raspoloženja koji se javljaju kod skoro 40% bolesnika (Walsh i Bennett, 2001), kao i suicidalne ideje kod skoro četvrtine bolesnika (Kostić i sar., 2010). Svi ovi psihijatrijski

simptomi se mogu udruženo javljati i prethoditi motornim simptomima. Pored toga, psihotični simptomi, kao što su halucinacije i paranoidne psihoze sa sumanutim idejama se javljaju kod jedne trećine bolesnika na antiparkinsonim lekovima (Goetz i sar., 1998a). Ovi lekovi mogu izazvati ili pogoršati psihotične simptome, pri čemu nije uočena direktna povezanost sa primenjenom dozom. (Goetz i sar., 1998b).

### **1.2.3. Terapija Parkinsonove bolesti**

Terapija PB je kompleksna oblast koja se konstantno razvija, a dva glavna pravca istraživanja idu u smeru (i) otkrivanja terapije koja bi dovela do usporavanja ili odlaganja progresije bolesti, ili (ii) usavršavanja simptomatske terapije koja deluje na motorne i nemotorne manifestacije bolesti. Postojanje duge premotorne faze bolesti čini PB idealnim kandidatom za ispitivanje neuroprotektivnih terapija, ali problem predstavlja teško postavljanje dijagnoze u toj fazi kao i nepoznavanje tačne etiologije bolesti (Shannon, 2004).

Primena simptomatske medikamentne terapije PB je započela šezdesetih godina prošlog veka kada je, kao što je već spomenuto, utvrđen deficit dopamina u strijatumu kod bolesnika sa PB (Hornykiewicz, 2010). S obzirom da dopamin ne prolazi krvno-moždanu barijeru, kao zamena je najpre primenjen dihidroksifenilalanin (DOPA), ali su se prvi rezultati pokazali nekonzistentnim. Ubrzo je otkriveno da stereoizomer L-DOPA (levodopa), primenjen i u manjim dozama tokom dužeg vremenskog perioda, dovodi do značajnog poboljšanja stanja bolesnika (Cotzias i sar., 1967; Shannon, 2004). Od tada, levodopa predstavlja „zlatni standard“ simptomatske medikamentne terapije PB. Danas se koriste i modifikovani oblici levodope koji imaju produženo oslobađanje i time se postiže dugotrajniji efekat, ali još uvek nije moguće izbeći nastanak motornih komplikacija u vidu diskinezija. Drugi dostupni lekovi su dopaminski agonisti, inhibitori katehol-O-metil transferaze, inhibitori monoamino oksidaze B, amantadin i antiholinergici (Olanow, 1990; Parkinson Study Group, 1996; Sternic i sar., 1998; Antonini i sar., 2009; Kostić, 2009).

Sa progresijom simptoma, terapija postaje kompleksnija i mnogo manje efikasna, što dovodi do dužih perioda sa parkinsonim simptomima („off“ periodi) i pojave diskinezija (Kostić i sar., 2002; Shannon, 2004). Kod određenog broja bolesnika sa uznapređovalom bolešću ili u slučaju nedelotvornosti terapije postoji mogućnost primene hiruške terapije. Duboka moždana stimulacija subtalamičkih jedara korišćenjem implantiranih pulsnih generatora dobija sve više na značaju. Efikasnost ove terapije je veća u poređenju sa medikamentnom terapijom u slučajevima uznapređovale PB sa motornim komplikacijama uzrokovanim levodopom (Shannon, 2004; Deuschl i sar., 2006).

### **1.3. Etiologija Parkinsonove bolesti**

Uprkos brojnim istraživanjima sprovedenim u poslednje dve decenije, etiologija PB je i dalje u najvećoj meri nepoznata. Dugo vremena se smatralo da su u nastanku PB ključni sredinski faktori, dok je kasnije primat preuzela hipoteza o interakciji genetičkih i sredinskih faktora. U poslednjih 10 godina, sa otkrivanjem novih gena asociраних sa PB, fokus je značajno pomeren ka genetičkim faktorima i njihovoj međusobnoj interakciji.

Ideja o uticaju faktora spoljašnje sredine na nastanak PB je dobila zamah sedamdesetih godina prošlog veka kada je otkriveno da jedan od sastojaka sintetičkih opijata, 1-metil-4-fenil tetrahidropiridin (MPTP), može da dovede do simptoma tipične PB ranog početka, ali koja patološki pokazuje nigralnu degeneraciju bez LT (Vingerhoets i sar., 1994; Langston i sar., 1999). Nakon ovog otkrića ispitivana je izloženost brojnim hemijskim supstancama kao faktor rizika za nastanak PB (Davis i sar., 1979; Langston i sar., 1983; Valjinac i sar., 2010).

Veliki broj epidemioloških studija se bavi ispitivanjem odnosa između izloženosti pesticidima i incidence PB. Meta-analiza koja je obuhvatila 19 ovakvih studija je pokazala odnose šansi od 1,94 za razvoj PB kod ljudi koji su tokom života izloženi pesticidima (Priyadarshi i sar., 2000). Mehanizam delovanja pesticida na razvoj simptoma PB je i dalje nejasan, iako je pokazano da tridifan i tiofosfatni pesticidi i insekticidi dovode do inhibicije

kompleksa I respiratornog lanca i time narušavaju funkciju mitohondrija (Butler i Murray, 1997; Berger i Sultatos, 1997; Moody i Hammock, 1987). Značaj ovog otkrića je u tome što je defekt kompleksa I respiratornog lanca otkriven i u substanci nigri (SN) kod bolesnika sa sporadičnom PB (Greenamyre i Hastings, 2004).

Još jedan faktor spoljašnje sredine čiji je uticaj na incidencu PB ispitivan jeste ishrana. Analiziran je unos različitih nutritijenata i njihov štetni ili protektivni značaj u patogenezi PB. Neke studije su pokazale povezanost visokog unosa masti sa nastankom PB (Johnson i sar., 1999; Lai i sar., 2002), dok su druge studije pokazale protektivni uticaj unosa niacina i askorbinske kiseline (Hellenbrand i sar., 1996) ili orašastih plodova i povrća (Golbe i sar., 1988).

Suprotno očekivanjima, jedan od zapaženih protektivnih faktora u pogledu nastanka PB jeste pušenje cigareta. Prvobitna ideja je bila ispitivanje pušenja kao faktora rizika, ali je veći broj studija pokazao da osobe koje nikada nisu pušile imaju dva puta veći rizik za razvoj PB (Hernan i sar., 2001; Paganini-Hill, 2001; Grandinetti i sar., 2004). Iako definitivnog objašnjenja za ovakve rezultate istrživanja nema, nekoliko teorija je ponuđeno. Jedna od ideja je da nikotin stimuliše nikotinske acetilholinske receptore što dovodi do otpuštanja dopamina i neuroprotekcije dopaminergičkih neurona (Fowler i sar., 1996; Ross i Petrovitch, 2001; Quik i Kulak, 2002; Fowler i sar., 2003). Sa druge strane, moguće je da kod bolesnika sa PB narušeni mesolimbčki dopaminergički sistem formira određenu strukturu ličnosti koja se odlikuje sklonošću ka zavisnostima i smanjenom potrebom za traganjem za novinama (Menza i sar., 1993). Postoji i novija teorija da iza ovog naizgled sredinskog faktora, leži genetička osnova, i da su DNK polimorfizmi koji smanjuju toleranciju na duvanski dim, istovremeno udruženi sa povećanim rizikom za PB (Elbaz i Tranchant, 2007).

## **1.4. Genetička osnova Parkinsonove bolesti**

U okviru genetičkih faktora asociranih sa PB identifikovane su promene u genima koje uzrokuju bolest, zatim one koje predstavljaju faktore rizika, i one koje mogu imati modifikujući efekat na pojavu i tok bolesti. Monogenske forme, uzrokovane mutacijama u pojedinačnim genima, obuhvataju između 3% i 5% obolelih od PB. Ipak, kod većine bolesnika uzrokom bolesti se smatraju interakcije nekoliko gena, epigenetički faktori, kao i uticaj agenasa spoljašnje sredine na gensku ekspresiju (Klein i Westenberger, 2012).

### **1.4.1. Klasifikacija genetičkih formi Parkinsonove bolesti**

Prema nomenklaturi koja se tradicionalno koristi u označavanju genetičkih formi PB svaki hromozomski lokus asociran sa PB je označen kao “*PARK*” lokus i dodeljen mu je redni broj prema redosledu otkrivanja (*PARK1*, *PARK2*, *PARK3* itd.). Postoji nekoliko problema proizašlih iz ove klasifikacije. Prvi problem predstavlja činjenica da su kao “*PARK*” označeni i tačno definisani geni, ali i lokusi u okviru kojih još uvek nisu otkriveni geni koji bi dovodili do PB. Drugi problem su geni za koje nije potvrđena veza sa nastankom PB tj. koji nisu identifikovani u drugim studijama sem u onoj u kojoj su prvi put publikovani. Na kraju, ovom nomenklaturom je obuhvaćen i jedan broj gena koji predstavljaju faktore rizika za razvoj PB, dok je jedan deo izostavljen. Predložena je nova nomenklatura kojom bi prefiks *PARK* označavao monogensku formu PB uzrokovanu potvrđenim mutacijama u genu čiji bi naziv takođe bio naveden (npr. *PARK-SNCA*, *PARK-LRRK2* itd.). Lista “*PARK*” lokusa sa kliničkom klasifikacijom, genima (ukoliko su poznati) i statusom gena (potvrđeni ili nepotvrđeni) je data u Tabeli 1.



Tabela 1. Lista “*PARK*” lokusa sa navedenim genima i kliničkom prezentacijom

<b>Simbol</b>	<b>Lokus</b>	<b>Klinička prezentacija</b>	<b>Gen</b>	<b>Status</b>
<b><i>PARK1</i></b>	4q21-22	PB ranog početka	<i>SNCA</i>	potvrđen
<b><i>PARK2</i></b>	6q25.2–q27	PB ranog početka	<i>Parkin</i>	potvrđen
<b><i>PARK3</i></b>	2p13	PB, tipična	Nepoznat	nepotvrđen; mogući faktor rizika
<b><i>PARK4</i></b>	4q21–q23	PB ranog početka	<i>SNCA</i>	isti lokus kao i <i>PARK1</i>
<b><i>PARK5</i></b>	4p13	PB, tipična	<i>UCHL-1</i>	nepotvrđen
<b><i>PARK6</i></b>	1p35–p36	PB ranog početka	<i>PINK1</i>	potvrđen
<b><i>PARK7</i></b>	1p36	PB ranog početka	<i>DJ-1</i>	potvrđen
<b><i>PARK8</i></b>	12q12	PB, tipična	<i>LRRK2</i>	potvrđen i kao faktor rizika
<b><i>PARK9</i></b>	1p36	Kufor-Rakebov sindrom	<i>ATP13A2</i>	potvrđen
<b><i>PARK10</i></b>	1p32	PB, tipična	Nepoznat	potvrđen lokus kao faktor rizika
<b><i>PARK11</i></b>	2q36-27	PB kasnog početka	<i>GIGYF2</i>	nepotvrđen
<b><i>PARK12</i></b>	Xq21–q25	PB, tipična	Nepoznat	potvrđen lokus kao faktor rizika
<b><i>PARK13</i></b>	2p12	PB, tipična	<i>HTRA2</i>	nepotvrđen
<b><i>PARK14</i></b>	22q13.1	distonija-parkinsonizam sindrom	<i>PLA2G6</i>	potvrđen
<b><i>PARK15</i></b>	22q12–q13	parkinsono-piramidalni sindrom	<i>FBOX07</i>	potvrđen
<b><i>PARK16</i></b>	1q32	PB, tipična	Nepoznat	potvrđen lokus kao faktor rizika
<b><i>PARK17</i></b>	16q11.2	PB, tipična	<i>VPS35</i>	potvrđen
<b><i>PARK18</i></b>	3q27.1	PB, tipična	<i>EIF4G1</i>	nepotvrđen
<b><i>PARK19</i></b>	1p31.3	juvenilni parkinsonizam	<i>DNAJC6</i>	nepotvrđen
<b><i>PARK20</i></b>	21q22.11	juvenilni parkinsonizam	<i>SYNJ1</i>	nepotvrđen

Na osnovu načinu nasleđivanja, monogenske PB se dele na autozomno-dominantne i autozomno-recesivne. Prema definiciji, kod autozomno-dominantnog nasleđivanja je dovoljan jedan mutirani alel za nastanak bolesti, dok su kod autozomno-recesivnog nasleđivanja za nastanak bolesti neophodne dve iste mutacije (homozigot) ili dve različite mutacije na dva alela (složeni heterozigot).

Bitno je naglasiti da se mendelovsko nasleđivanje ipak ne može jednostavno primeniti u slučaju kompleksnog poremećaja kao što je PB. Pojedini nosioci mutacija, pre svega onih sa dominantnim nasleđivanjem (npr. *SNCA* i *LRRK2*), nikada ne razviju simptome bolesti, što predstavlja fenomen smanjene penetrantnosti. Sa druge strane, u genima *Parkin* i *PINK*, asociranim sa autozomno-recesivnom PB i heterozigotne mutacije dovode do nastanka simptoma kod jednog broja nosilaca (Klein i Westenberger, 2012). Varijabilna ekspresivnost je takođe uočena kod monogenских formi PB. Naime, nosioci identične mutacije, čak i u okviru iste porodice, mogu ispoljavati različite kliničke prezentacije bolesti. U pojedinim porodicama, primećena je i pojava fenokopija, odnosno ispoljavanje bolesti kod članova porodice koji nisu nosioci “porodične” mutacije (Klein i sar., 2011).

U literaturi je opisano nekoliko slučajeva bolesnika koji su nosioci mutacija u više od jednog gena koje uzrokuju monogenske PB. Ovakvi nalazi ukazuju na potencijalne interakcije između gena asociranih sa monogenским formama PB, čemu u prilog govore i studije na animalnim modelima (Clark i sar., 2006; Park i sar., 2006; Dhungel i sar., 2015).

#### **1.4.2. Autozomno-dominantne forme Parkinsonove bolesti**

Danas su poznata tri gena: *SNCA*, *LRRK2* i *VPS35*, u kojima su potvrđene mutacije odgovorne za nastanak PB sa autozomno-dominantnim nasleđivanjem, dok za mutacije u *EIF4G1* genu još uvek nije moguće potvrditi patogenost (Tabela 2.). Dominantne mutacije u ovim genima najverovatnije utiču na to da protein dobije novu izmenjenu funkciju (eng. *gain-of-function*), iako je za pojedine mutacije u *SNCA* genu predložen mehanizam

haploinsuficijencije, pri kom se ekspresijom samo nemutiranog alela ne dobija dovoljna količina funkcionalnog proteina (Kobayashi i sar., 2003).

Tabela 2. Autozomno-dominantne forme PB

Simbol/Gen	Patogene mutacije	Patološki nalazi	Klinička prezentacija
<i>PARK1 i 4/ SNCA</i>	tačkaste mutacije duplikacije i triplikacije	LT, u nekim slučajevima atipični (nalik na MSA patologiju)	brzo progresivna PB ranog početka
<i>PARK8/ LRRK2</i>	tačkaste mutacije, 7 potvrđenih	LT u najvećem broju slučajeva	tipična PB kasnog početka, sa pojednim slučajevima ranog početka
<i>PARK17/ VPS35</i>	samo jedna tačkasta mutacija	nepoznati	tipična PB kasnog početka
<i>PARK18/ EIF4G1</i>	samo dve tačkaste mutacije	nepoznati	tipična PB kasnog početka

LT- Lewijeva tela, MSA- multipla sistemska atrofija

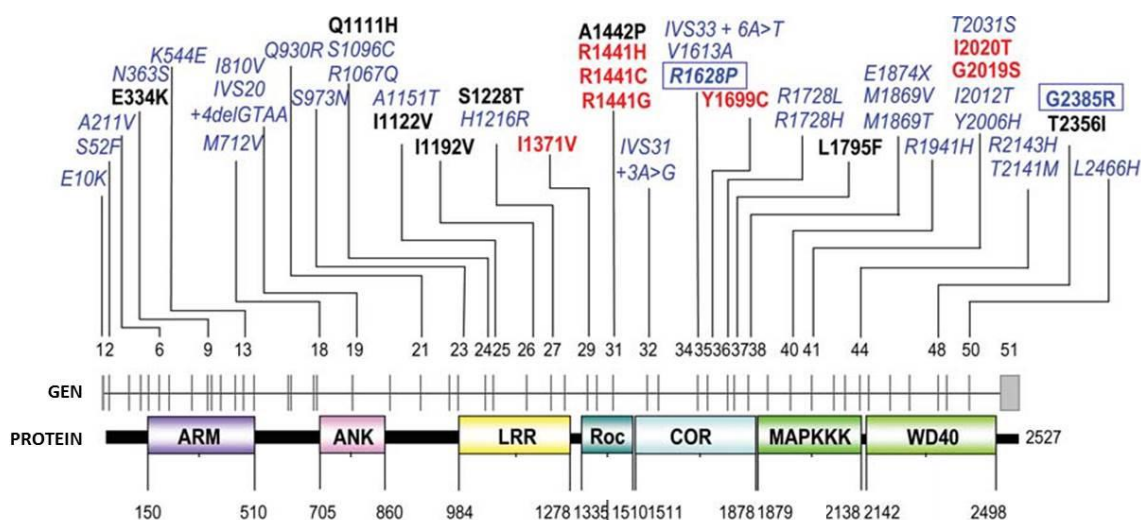
U narednim poglavljima su detaljnije opisane struktura i funkcija gena *LRRK2* i *VPS35* koji su predmet ovog istraživanja, a zatim su ukratko opisani geni *SNCA* i *EIF4G1*.

#### 1.4.2.1. *PARK8 / LRRK2* gen

*PARK8* lokus kod PB sa autozomno-dominantnim nasleđivanjem je prvi put mapiran u japanskoj porodici u kojoj su zahvaćeni članovi imali tipičnu prezentaciju PB kasnog početka bez demencije (Funayama i sar. 2002), a ubrzo je potvrđen i u nekoliko evropskih porodica (Zimprich i sar. 2004a). Dve nezavisne grupe istraživača su pozicionim kloniranjem otkrile mutacije promenjenog smisla u veoma velikom genu *LRRK2* (eng. *Leucine Rich Repeat Kinase 2*) kod nekoliko porodica iz Baskije (regija u Španiji), Velike Britanije i Amerike (Paisan-Ruiz i sar., 2004; Zimprich i sar., 2004a). Protein kodiran ovim genom je nazvan Dardarin prema baskijskoj reči “dardara” koja znači tremor, jer je prva mutacija identifikovana kod članova porodice iz Baskije koji su imali tremor kao predominantni simptom.

## Pozicija i struktura *LRRK2* gena

*LRRK2* gen je lociran na hromozomu 12p12, obuhvata region od 144kb i sastoji se od 51 egzona. Kodira protein koji se sastoji od 2527 aminokiselina i ima nekoliko funkcionalnih domena (Slika 3): armadilo domen (ARM), domen sa ankirin ponovcima (ANK), domen bogat ponovcima leucina (LRR), Ras domen kompleksnih proteina (ROC), karboksi kraj ROC domena (COR), domen sa funkcijom kinaze kinaze mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPKKK), i domen WD40 koji je bogat ponovcima triptofana i aspartata (Mata i sar. 2006a).



Slika 3. Šematski prikaz *LRRK2* gena i funkcionalnih domena *LRRK2* proteina. Brojevi iznad šeme gena predstavljaju egzone, dok brojevi ispod šeme proteina označavaju pozicije graničnih aminokiselina domena proteina. Skraćenice ARM, ANK, LRR, Roc, COR, MAPKKK i WD40 predstavljaju funkcionalne domene *LRRK2* proteina i bliže su objašnjene u tekstu. Crvenim fontom su označene potvrđene patogene mutacije, crnim fontom potencijalno patogene, plavim italiciziranim fontom promene nepoznatog značaja, dok su plavim italiciziranim fontom i uokvirene označene promene koje predstavljaju faktor rizika za PB. Modifikovano prema Lesage i Brice, 2009.

## Mutacije u *LRRK2* genu

*LRRK2* gen ima 51 egzon, tako da je mali broj studija do sada analizirao čitav gen u različitim populacijama. Uprkos tome, mutacije u *LRRK2* genu su najučestaliji poznati uzrok autozomno-dominantne PB, opisane u oko 10% familijarnih slučajeva (Berg i sar., 2005; Khan i sar., 2005; Mata i sar., 2005; Di Fonzo i sar., 2006a; Johnson i sar., 2007; Nichols i sar., 2007; Xiromerisiou i sar., 2007; Pchelina i sar., 2008; Lesage i sar., 2009), kao i 3,6% bolesnika sa naizgled sporadičnom PB i 1,8% zdravih kontrola (Paisan-Ruiz i sar., 2008).

Preko 80 različitih tačkastih mutacija je do sada opisano u ovom genu, ali patogenost za većinu ovih retkih varijanti još uvek nije potvrđena (Funayama i sar., 2002; Paisan-Ruiz i sar., 2004; Zimprich i sar., 2004a; Mata i sar., 2006b; Nuytemans i sar., 2009). Osnovni problem u potvrdi patogenosti retkih varijanti je postojanje fenokopija i smanjena penetrantnost koja se ne može precizno proceniti zbog jako malog broja nosilaca mutacija. Pored toga, u većini slučajeva kasna pojava prvih simptoma, tako da genotip roditelja ostaje nepoznat i segregaciona analiza nije moguća (Paisan-Ruiz i sar., 2009).

Za sada je potvrđena patogenost za 7 mutacija: Asn1437His, Arg1441Cys, Arg1441Gly, Arg1441His, Tyr1699Cys, Gly2019Ser, and Ile2020Thr (Healy i sar., 2008; Aasly i sar., 2010). Pokazano je da su patogene mutacije grupisane u nekoliko egzona i pogadaju funkcionalno bitne regione koji su visoko konzervirani u različitim vrstama.

Daleko najučestalija je supstitucija c.6055G>A koja dovodi do Gly2019Ser mutacije u kinaznom domenu proteina. Etnička pripadnost ima veliki uticaj na prevalencu ove mutacije, tako da se javlja kod 15% do 20% Aškenazi Jevreja i oko 40% severnoafričkih Arapa sa PB (Lesage i sar., 2006; Ozelius i sar., 2006; Zabetian i sar., 2006a; Orr-Urtreger i sar., 2007). Najmanje 3 različita haplotipa sa Gly2019Ser mutacijom su do sada prijavljena. Najčešći haplotip imaju nosioci mutacije iz Evrope, severne Afrike i Bliskog istoka (Zabetian i sar., 2006a; Warren i sar., 2008; Bar-Shira i sar., 2009) i pokazano je da je ovaj haplotip star najmanje 4000 godina (Lesage i sar., 2004). Druga dva haplotipa su veoma retka i pojavila su se znatno kasnije. Jedan je utvrđen kod 5

evropskih i američkih porodica (Zabetian i sar., 2005), a drugi je specifičan za japansku populaciju (Tomiyama i sar., 2006; Zabetian i sar., 2006b), ali je nađen i u jednoj turskoj porodici (Pirkevi i sar., 2009).

Druga najčešća aminokiselina koja je pogođena mutacijama u *LRRK2* proteinu je arginin na poziciji 1441, u Roc GTPaznom domenu. Na ovoj poziciji su najpre opisane promene R1441C (c.4321C>T) i R1441G (c.4321C>G) koje pogađaju isti nukleotid (Paisan-Ruiz i sar. 2004; Zimprich i sar. 2004b), a zatim i promena na susednom nukleotidu R1441H (c.4322G>A) (Mata i sar. 2005; Zabetian i sar. 2005; Spanaki i sar. 2006; Ferreira i sar. 2007; Lesage i sar. 2009). R1441C mutacija je najverovatnije geografski ograničena na sever Španije i javlja se u oko 20% familijarnih formi PB u baskijskoj populaciji, gde je pokazan efekat osnivača koji datira iz XVII veka (Paisan-Ruiz i sar., 2004; Mata i sar., 2005; Simon-Sanchez i sar., 2006; Gonzalez-Fernandez i sar., 2007; Gorostidi i sar., 2009; Mata i sar., 2009). Nasuprot tome, najčešća mutacija na ovoj poziciji R1441C, kao i mnogo ređa R1441H su nastale nezavisno više puta u različitim regionima (Di Fonzo i sar., 2006; Ross i sar. 2009; Shojaee i sar., 2009). Za razliku od Gly2019Ser mutacije promene na kodonu 1441 su visoko penetrantne (Haugarvoll i sar., 2008).

Mutacije Y1699C (c.5096A>G) i I2020T (c.6059 T>C) su detektovane u nekoliko studija, ali sa mnogo manjom učestalošću od predhodnih (Paisan-Ruiz i sar., 2004; Zimprich i sar., 2004b; Berg i sar., 2005; Funayama i sar., 2005; Khan i sar., 2005; Ohta i sar., 2007). Najnovije otkrivena patogena mutacija u Roc domenu, N1437H (c.4309A>C), je opisana u nekoliko norveških porodica (Aasly i sar., 2010).

Interesantno je da, za razliku od multiplikacija *SNCA* gena, kod *LRRK2* nije primećen dozni efekat. Homozigotni nosici mutacija su identifikovani u populaciji severnoafričkih Arapa, koji se klinički nisu razlikovali od heterozigotnih nosilaca (Ishihara i sar., 2006; Lesage i sar., 2008b).

Objavljene patohistološke analize kod bolesnika sa *LRRK2* mutacijama su vrlo ograničenog broja, ali je tipična patologija sa Levijevim telima opisana u najvećem broju slučajeva (Smith i sar., 2005). Mehanizam kojim bi se povezali *LRRK2* protein i

akumulacija SNCA proteina još uvek nije poznat, ali nalazi ukazuju da je moguća i direktna interakcija ovih proteina (Lin i sar., 2009).

### **Ekspresija i funkcija *LRRK2* gena**

Domeni *LRRK2* proteina i njihov raspored su visoko konzervirani kod kičmenjaka i imaju homologiju sa *ROCO* familijom proteina za koje je karakteristično da imaju u jednom molekulu obuhvaćene i GTPaznu i kinaznu enzimsku aktivnost (Bosgraaf i sar., 2003). Biohemijske studije su pokazale da *LRRK2* protein ima sposobnost autofosforilacije i fosforilacije drugih supstrata (West i sar., 2005; Jaleel i sar., 2007; Greggio i sar., 2008; Imai i sar., 2008), kao i da je ova kinazna aktivnost regulisana GTPaznim domenom (Smith i sar., 2006; Guo i sar., 2007; Ito i sar., 2007; Liu i sar., 2010). Pored toga, GTPazni domen najverovatnije ima i druge targete sem kinaznog domena i obavlja funkciju nezavisno od njegovog prisustva (Ray i Liu, 2012). Domeni armadilo, ankirin, LRR i WD40 su značajni u protein-protein interakcijama što ukazuje da *LRRK2* protein ima ulogu u povezivanju proteina u multiproteinskim signalnim putevima i učestvuje u brojnim ćelijskim funkcijama (Corti i sar., 2011).

Funkcionalni *LRRK2* protein se najverovatnije nalazi u formi homodimera, što je česta pojava kod protein kinaza (Gloeckner i sar., 2009). Pokazano je da pojedine mutacije mogu da dovedu do destabilizacije forme dimera i pretpostavljeno je da je kinazna aktivnost zavisna od dimerizacije (Greggio i sar., 2008), ali u kojoj meri je dimerizacija narušena u PB nije razjašnjeno.

*LRRK2* proteina je pored centralnog nervnog sistema, eksprimiran i u većini drugih sistema organa, a naročito visok nivo je zapažen u plućima i bubrezima (Paisan-Ruiz i sar., 2004; Zimprich i sar., 2004a). Lociran je i u pojedinim ćelijama imunog sistema (Gardet i sar., 2010). U ćelijama, ovaj protein se nalazi u citoplazmi i spoljašnjoj membrani mitohondrija, kao i u plazma membrani, lizozomima, endozomima, transportnim vezikulama, Golđi aparatu, mikrotubulama, sinaptičkim vezikulama i lipidnim raftovima (Biskup i sar., 2006; Hatano i sar., 2007).

Iako funkcija LRRK2 proteina još uvek nije poznata, njegova ekspresija, lokalizacija i struktura ukazuju na uključenost u veći broj ćelijskih procesa. Jedna od mogućih uloga je u homeostazi dopamina i vezikularnom transportu. U presinaptičkim vezikulama, utišavanje LRRK2 proteina dovodi do njihove redistribucije, kao i do promene dinamike recikliranja i kinetike, što govori u prilog uloge ovog proteina u sinaptičkom vezikularnom transportu (Piccoli i sar., 2011). Mutacije u *LRRK2* genu utiču na neurotransmisiju dopamina i oslobađanje kateholamina (Tong i sar., 2009) i dovode do gubitka nigrostrijatnih dopaminergičkih neurona.

Na protektivnu ulogu LRRK2 proteina na funkciju mitohondrija ukazuju nalazi da nemutirani protein ublažava peroksidom indukovani oksidativni stres, dok mutirani protein ne ispoljava takav efekat (Liou i sar., 2008). Mitohondrijska disfunkcija je jedan od pretpostavljenih okidača u patogenezi PB, tako da uticaj promena u *LRRK2* genu na strukturu i funkciju mitohondrija može biti jedan od načina asocijacije ovog proteina sa PB. Drugi načini se mogu ostvariti kroz puteve razgradnje proteina, koji su detaljnije opisani u poglavljima 1.4.6. i 1.4.7. Promene u regulaciji autofagije su zabeležene i prilikom prekomerne ekspresije mutiranog proteina i prilikom utišavanja nemutiranog proteina u različitim model sistemima (Biskup i sar., 2006; Ferree i sar., 2012), dok je poremećaj funkcije ubikvitin-proteazomnog sistema primećen kod prekomerne ekspresije nemutiranog proteina što je dovodilo do akumulacije različitih supstrata, uključujući alfa-sinuklein i ubikvitin (Lichtenberg i sar., 2011).

S obzirom na strukturu LRRK2 proteina ispitivane su njegove potencijalne veze sa drugim proteinima asociiranim sa PB. Nekoliko studija je pokazalo da je Parkin jedan od proteina sa kojim LRRK2 interaguje preko svog ROC domena, ali to najverovatnije ne pospešuje ubikvitinaciju LRRK2 proteina (Smith i sar., 2005). Ekspresija humanog Parkina kod vinskih mušica sa 2019S mutacijom u *LRRK2* genu, pokazala je protektivni efekat na dopaminergičku neurodegeneraciju (Ng i sar., 2009). Interakcija je pokazana i sa proteinima DJ-1 i PINK1 i pretpostavljeno je da autofagija može biti tačka funkcionalne konvergencije (Esteves i sar., 2014). Pokazano je i da je nivo LRRK2 proteina u pozitivnoj korelaciji sa fosforilacijom i agregacijom alfa-sinukleina u delovima mozga sa patološkim



promenama karakterističnim za PB (Guerreiro i sar., 2012), dok je u nedavnoj studiji pokazano da uklanjanje endogenog alfa-sinukleina dramatično smanjuje degeneraciju zavisnu od *LRRK2* mutacija (Skibinski i sar., 2014). Ove studije ukazuju na interakciju *LRRK2* proteina i alfa-sinukleina, iako priroda njihovih odnosa još uvek nije rasvetljena.

#### 1.4.2.2. *PARK17 / VPS35* gen

*PARK17* je jedna od najskorije potvrđenih autozomno dominantnih formi PB. Tokom 2011. godine, dve grupe su nezavisno objavile indentifikaciju iste mutacije promenjenog smisla u *VPS35* genu (eng. *Vacuolar Protein Sorting 35*), u nekoliko porodica sa autozomno-dominantnom PB kasnog početka i visokom ali nekompletnom penetrantnošću (Vilarino-Guel i sar., 2011; Zimprich i sar., 2011). U ovim studijama je pokazano da se klinička slika bolesnika sa mutacijom u *VPS35* genu ispoljava kao parkinsonizam sa predominantnim tremorom, nešto ranijim početkom bolesti u odnosu na idiopatsku PB i pozitivnim odgovorom na levodopu.

#### Pozicija i struktura *VPS35* gena

*VPS35* gen je lociran na dugom kraku hromozoma šesnaest (16q12) i sastoji se od 17 egzona (Slika 4.). Pripada familiji gena koji kodiraju proteine koji učestvuju u sortiranju vakuola (*VPS* geni) i visoko su konzervirani od kvasaca do ljudi.



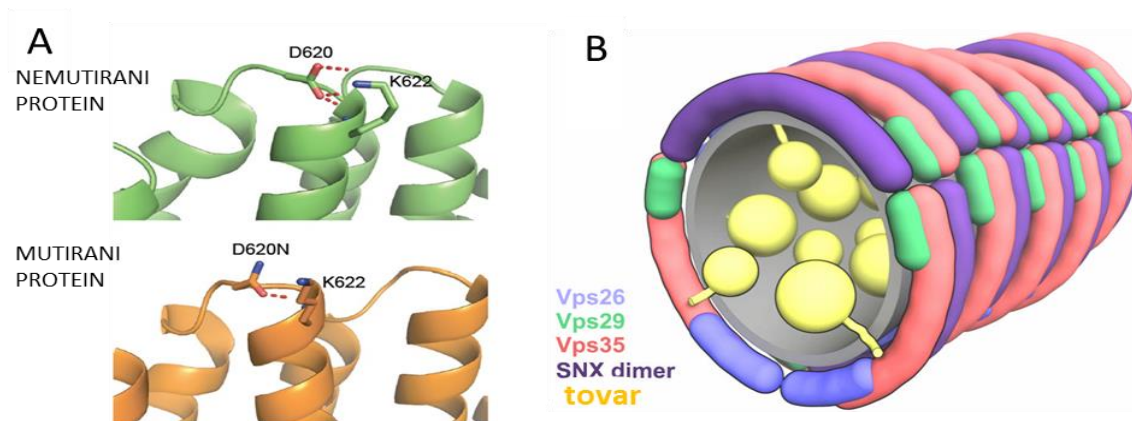
Slika 4. Preuzeto sa Genetic Home Reference (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/VPS35>).

#### Mutacije u *VPS35* genu

Jedina potvrđena patogena mutacija u ovom genu je c.1858G>A (p.Asp620Asn) koja je locirana u petnaestom egzonu. Ova mutacija je identifikovana u nekoliko studija koje su obuhvatila bolesnike sa PB evropskog porekla (Vilariño-Güell i sar., 2011;

Zimprich i sar., 2011; Kumar i sar., 2012; Lesage i sar., 2012; Sharma i sar., 2012; Sheerin i sar., 2012), ali i dve studije na PB bolesnicima azijskog porekla (Ando i sar., 2012; Sharma i sar., 2012), dok u studiji koja je obuhvatila bolesnike iz Južne Afrike nije detektovana promena (Blanckenberg i sar., 2014). Prema sumiranim podacima iz literature ukupna učestalost ove mutacije je 0.11% (24/21,762) među bolesnicima, dok kod 16,380 kontrolnih subjekata nije identifikovana (Blanckenberg i sar., 2014).

Rezultati segregacione analize idu u prilog patogenosti p.Asp620Asn mutacije, a pokazano je da zamena asparaginske kiseline na poziciji 620 u proteinu asparaginom predstavlja promenu kiselog u bazni ostatak i dovodi do oštećenja proteina (Vilarino-Guel i sar., 2011). Asparaginska kiselina često formira vodonične veze sa lizinom na poziciji 622 u VPS35, dok u mutiranom proteinu asparagin ove veze formira mnogo ređe što povećava fleksibilnost proteina u navedenom regionu (Slika 5A.).



Slika 5. A – Predikcija proteinske strukture i kapaciteta formiranja vodoničnih veza za nemutiranoj i mutiranoj poziciji p.620 u VPS35 proteinu. Modifikovano prema Zimprich i sar., 2011. B – Model retromer kompleksa, modifikovano prema Hierro i sar., 2007.

Analizom haplotipova nosilaca ove mutacije pokazano je da je ona nastala u najmanje četiri nezavisna mutaciona događaja što ukazuje da je pozicija c.1858 mutacioni hotspot (Vilarino-Guel i sar., 2011).

Pored ove mutacije, identifikovano je nekoliko promena u kodirajućim regionima VPS35 gena, kao što su p.M57I, p.I241M, p.P316S i p.R524W, ali uloga ovih mutacija u

razvoju simptoma PB nije utvrđena (Vilarino-Guel i sar., 2011; Zimprich i sar., 2011; Sharma i sar., 2012; Blanckenberg i sar., 2014).

### **Ekspresija i funkcija *VPS35* gena**

VPS35 protein je visoko konzervirana komponenta retromer kompleksa koji vrši retrogradni transport proteina od endozoma, nazad ka Goldžijevom aparatu (Seaman, 2005; Bonifacino i Rojas, 2006), i na taj način ostvaruje ulogu u recikliranju proteina. Kod sisara se ovaj heteropentamerni kompleks sastoji od proteina VPS35, VPS29 i VPS26A ili VPS26B koji imaju ulogu u prepoznavanju proteina koje treba transportovati. Pored njih, u kompleks su uključeni i sortirajući neksini SNX1 ili SNX2 i SNX5 ili SNX6 (Slika 5B.). VPS35 predstavlja najveću subjedinicu ovog kompleksa sa molekularnom težinom od 92 kDa i funkcioniše kao centralna platforma koja povezuje proteine VPS26 i VPS29 (Hierro i sar., 2007).

U studiji Braschija i saradnika je pokazano da je retromer kompleks uključen i u transport od mitohondrija do peroksizoma MAPL proteina, koji učestvuje u regulaciji dinamike fisije i fuzije mitohondrija. VPS35 protein posreduje u transportu navedenog proteina, zajedno sa VPS26 proteinom (Braschi i sar., 2010).

Mehanizam kojim mutacija u *VPS35* genu učestvuje u patogenezi PB nije još uvek razjašnjen. Vilarino-Guel i saradnici su pretpostavili da mutacija u *VPS35* genu dovodi do narušavanja prepoznavanja i vezivanja proteina koji se transportuju i da to dovodi do smanjenog recikliranja, slično kao u slučaju alfa-sinuklein i LRRK2 proteina koji su takođe uključeni u vezikularni transport (Caudle i sar., 2008; Berwick i sar., 2011). Zimprich i saradnici (Zimprich i sar., 2011) su pokazali simulacijom molekularne dinamike da se asparaginska kiselina na poziciji 620 u proteinu nalazi na ivici heliksa i da intereaguje sa proteinom VPS29.

### 1.4.2.3. Ostale forme autozomno-dominantne Parkinsonove bolesti

#### ***PARK1 (PARK4) / SNCA gen***

*SNCA* je prvi gen u kome su identifikovane mutacije koje dovode do nastanka autozomno-dominantne PB. Prva potvrđena mutacija, p.A53T, je otkrivena istovremeno u dve grčke i jednoj italijanskoj porodici (Polymeropoulos i sar. 1997) i ona je ujedno i najčešća mutacija u *SNCA* genu.

Mutacije u *SNCA* genu su veoma retke, i do sada su opisane samo 3 tačkaste mutacije promenjenog smisla (A30P, E46K i A53T), kao i duplikacije i triplikacije čitavog gena (Klein i Schlossmacher, 2006).

*SNCA* gen se sastoji od 6 egzona i kodira protein alfa-sinuklein lociran u citoplazmi. Ovaj protein u solubilnom stanju gotovo da nema sekundarnu strukturu, dok u interakciji sa ćelijskom membranom zauzima konformaciju alfa-heliksa. Pokazano je da mutirani protein ima tendenciju formiranja beta-ploče, što sa jedne strane onemogućava njegovu razgradnju u lizozomima, a sa druge strane teži agregaciji i formiranju oligomera, a zatim i fibrila (Bendor i sar., 2013).

Bolesnici sa *SNCA* mutacijama imaju rani početak bolesti, najčešće pre pedesete godine života, i povoljan odgovor na levodopu. Bolest se karakteriše brзом progresijom, često i demencijom, kao i autonomnim i psihijatrijskim poremećajima (Corti i sar., 2011).

#### ***PARK18 / EIF4G1 gen***

Prva mutacija u *EIF4G1* genu koja dovodi do PB (p.Arg1205His) je otkrivena u velikoj francuskoj porodici analizom vezanosti u čitavom genomu i direktnim sekvenciranjem (Chartier-Harlin i sar., 2011). U daljim istraživanjima otkrivene su, pored navedene, i mutacije p.Ala502Val, p.Gly686Cys, p.Ser1164Arg i p.Arg1197Trp, ali studije na velikom broju uzoraka nisu potvrdile njihovu povezanost sa nastankom PB (Schulte i sar., 2012). Može se pretpostaviti da mutacije u ovom genu predstavljaju ili izuzetno redak uzrok ili faktor rizika za PB.

*EIF4G1* gen kodira protein koji je deo kompleksa za inicijaciju translacije kod eukariota EI4F. Chartier-Harlin i saradnici su postavili hipotezu da otkrivene mutacije pogađaju sposobnost ćelije da brzo odgovori na uslove stresa, tako što menjaju translaciju informacionih RNK neophodnih za preživljavanje (Chartier-Harlin i sar., 2011).

U opisanim porodicama sa mutacijama u *EIF4G1*, bolest se manifestovala klasičnom kliničkom prezentacijom sa kasnim početkom, sporom progresijom, očuvanim kognitivnim sposobnostima i povoljnim odgovorom na levodopu.

### 1.4.3. Autozomno recesivne forme Parkinsonove bolesti ranog početka

Mutacije u tri gena: *Parkin*, *PINK1* i *DJ-1*, bilo u formi homozigota ili složenog heterozigota, su danas definitivno asocirane sa naslednom PB ranog početka. Bolest se karakteriše dobrim odgovorom na levodopu i generalno je bez atipične prezentacije (Tabela 3.). Mutacije u genima *Parkin* i *PINK1* su najčešći uzrok autozomno-recesivne PB ranog početka, dok je u pojedinim porodicama opisano i pseudo-dominantno nasleđivanje usled postojanja heterozigotnih nosilaca koji ispoljavaju simptome bolesti (Criscuolo i sar., 2006) ili samo prenose mutirani alel u narednu generaciju (Maruyama i sar., 2000; Lucking i sar., 2001). Penetrantnost je smanjena u malom broju slučajeva (Deng i sar., 2006).

Tabela 3. Autozomno-recesivne forme PB

Simbol/Gen	Patogene mutacije	Patološki nalazi	Klinička prezentacija
<i>PARK2/</i> <i>Parkin</i>	preko 170 tačkastih mutacija, egzonski rearanžmani	Bez LT u većini slučajeva	PB veoma ranog početka
<i>PARK6/</i> <i>PINK1</i>	oko 50 tačkastih mutacija, izuzetno retke velike delecije	LT u jednom patološkom nalazu	PB ranog početka
<i>PARK7/</i> <i>DJ-1</i>	oko 15 tačkastih mutacija, velike delecije	Nepoznati	PB ranog početka

LT- Lewijeva tela

U narednim poglavljima su detaljnije opisane struktura i funkcija *Parkin* gena koji je predmet ovog istraživanja, a zatim su ukratko opisani i geni *PINK1* i *DJ-1*.

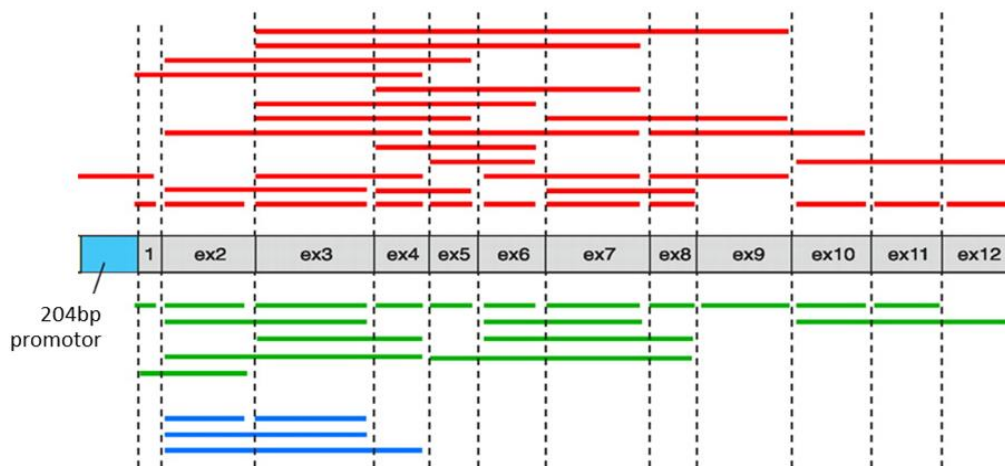
#### 1.4.3.1. *PARK2 / Parkin*

##### **Pozicija i struktura *Parkin* gena**

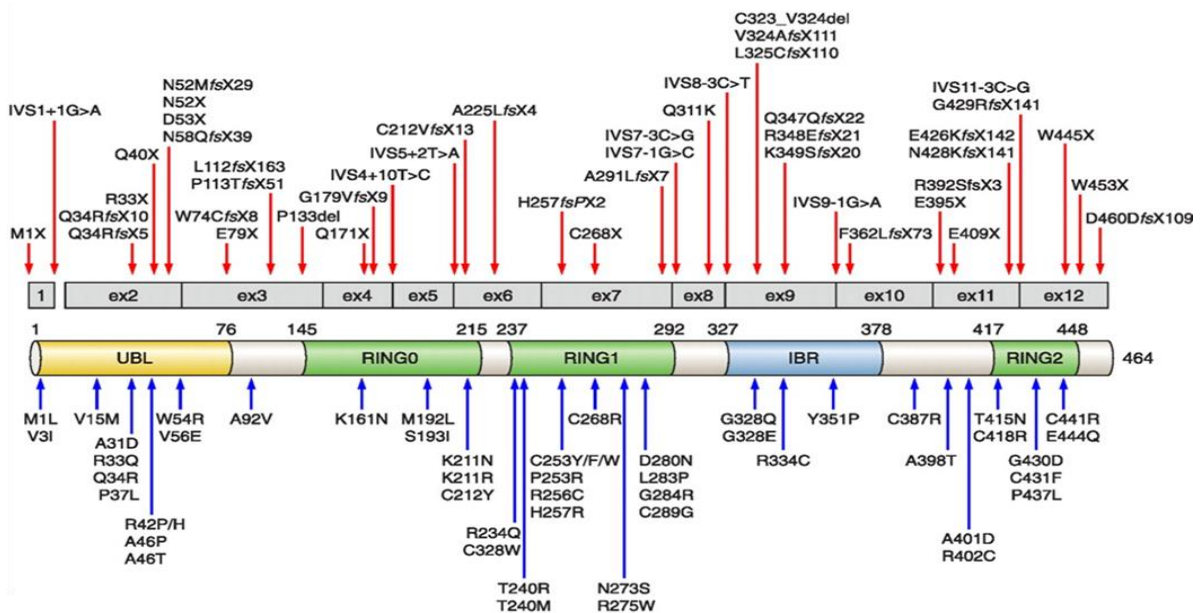
Analizama vezanosti kod 13 japanskih porodica sa juvenilnom PB mapiran je *PARK2* lokus na hromozomu 6q26, lociran u blizini *SOD2* lokusa (Matsumine i sar., 1997; Jones i sar., 1998; Tassin i sar., 1998). Pozicionim kloniranjem u ovom regionu je otkriven *PARK2* gen koji obuhvata oko 1,38Mb i sastoji se od 12 egzona (Slika 6. i 7.) (Kitada i sar., 1998; Asakawa i sar., 2001). Ovo je drugi najveći gen kod ljudi, posle gena za distrofin, i kodira protein Parkin koji se sastoji od 465 aminokiselina i pripada RBR (eng. *Ring Between Ring Fingers*) familiji E3 ubikvitin ligaza. Funkcionalni domeni Parkin proteina su: UBL (NH2 terminalni ubikvitinu sličan domen), RING0-2 (eng. *Really Interesting New Gene*) prstasti domeni, IBR (eng. *In Between Ring*) domen koji se nalazi između dva RING domena (Slika 7.).

##### **Mutacije u *Parkin* genu**

Do sada je prijavljeno preko 100 različitih mutacija koje uključuju mutacije promenjenog smisla, kao i delecije, duplikacije i rearanžmane egzona (Hattori i sar., 1998; Abbas i sar., 1999; Klein i sar., 2000; Hedrich i sar., 2002; Kann i sar., 2002; Klein i sar., 2003). Mutacije se nalaze u čitavom genu i pogađaju i N-terminalni UBL domen, kao i RBR domen (Slika 6. i Slika 7). Tačkaste mutacije utiču na lokalizaciju parkin proteina u ćeliji, njegovu rastvorljivost i sklonost ka agregaciji (Cookson i sar. 2003; Gu i sar. 2003; Wang i sar. 2005), dok insercije i delecije egzona dovode do gubitka funkcije proteina.



Slika 6. Šematski prikaz transkripta *PARK2* gena sa označenima delecijama, duplikacijama i triplikacijama egzona. Delecije su obeležene crvenim, duplikacije zelenim, a triplikacije plavim horizontalnim linijama. Modifikovano prema Corti i sar., 2011.



Slika 7. Šematski prikaz transkripta *PARK2* gena i funkcionalnih domena Parkin proteina. Brojevi iznad šeme proteina predstavljaju pozicije graničnih aminokiselina domena proteina. Funkcionalni domeni Parkin proteina: UBL, RING0-2 prstasti domeni, IBR domen koji se nalazi između dva RING domena. Crvenim strelicama su označene pozicije mutacija koje menjaju okvir čitanja, iskrajanje egzona ili dovode do terminacije sinteze proteina. Plavim strelicama su označene pozicije mutacija promenjenog smisla. Modifikovano prema Corti i sar., 2011.

PB izazvana *Parkin* mutacijama se karakteriše ranim početkom bolesti, sporijom progresijom i povoljnim odgovorom na manje doze levodope. Kod manjeg broja bolesnika se javljaju i neuobičajeni simptomi kao što su cervikalna distonija, autonomna disfunkcija, periferna neuropatija, distonija indukovana fizičkim naporom, kao i rane levodopom indukovane diskinezije (Gasser, 2009). *Parkin* mutacije su uzrok bolesti kod preko 50% bolesnika sa juvenilnom formom PB, sa početkom pre 20. godine života. Učestalost *Parkin* mutacija se smanjuje sa kasnijim početkom bolesti, tako da kod PB kasnog početka (posle 50 godina života) manje od 1% bolesnika ima homozigotne ili složene heterozigotne mutacije u ovom genu (Oliveri i sar., 2001; Klein i sar., 2003; Kay i sar., 2010).

Patološki, PB izazvana mutacijama u *Parkin* genu se karakteriše gubitkom neurona u SN, dok je *locus coeruleus* mnogo manje zahvaćen. U najvećem broju slučajeva ne dolazi do formiranja Levijevih tela (Takahashi i sar., 1994; Mori i sar., 1998), iako su opisani retki slučajevi sa prisustvom ovih inkluzija (Farrer i sar., 2001; Sasaki i sar., 2004; Pramstaller i sar., 2005). Nekoliko linija miševa sa izbačenim *PARK2* genom je konstruisano, ali iznenađujuće ni jedna od linija nije pokazala nigralnu degeneraciju, kao ni simptome motorne disfunkcije (Goldberg i sar., 2003; Itier i sar., 2003; Perez i sar., 2005). Registrovane su jedino blage promene u ponašanju miševa, kao i smanjeni broj noradrenergičkih neurona u *locus coeruleusu* u pojedinim sojevima (Itier i sar., 2003; Von Coelln i sar., 2004a; Perez i sar., 2005).

### **Ekspresija i funkcija *Parkin* gena**

*Parkin* je protein predominantno lociran u citoplazmi, ali i u sinaptičkim vezikulama, Goldži kompleksu, endoplazmatičnom retikulumu i spoljašnjoj membrani mitohondrija, kao i nukleusu (Shimura i sar., 2000; Kubo i sar., 2001; von Coelln i sar., 2004; Mouatt-Prigent i sar., 2004). U studijama na mozgovima adultnih miševa, kao i na PC12 ćelijama u kojima je izazvana prekomerna produkcija *Parkin* proteina, detektovano je da se jedan deo proteina nalazio i na spoljašnjoj membrani mitohondrija, sa strane citoplazme (Stichel i sar., 2000; Darios i sar., 2003). U ovoj studiji je i utvrđeno da *Parkin* ima ulogu u modulaciji oblika mitohondrija. Mogućnost da se *Parkin* nalazi i u



unutrašnjosti mitohondrija (Kuroda i sar., 2006) još uvek nije potvrđena, dok je u novijim studijama pokazano da oksidativni stres ili gubitak električnog potencijala mitohondrija dovode do regrutovanja Parkina na spoljašnjoj strani mitohondrijske membrane (Narendra i sar., 2008; Narendra i sar., 2009; Ziviani i sar., 2010). Uloga Parkina u održavanju stabilnosti mitohondrija je potvrđena i studijama na vinskih mušicama. Kod mušica koje su imale mutirani *parkin* gen tako da nema funkcionalnog proteina, primećeno je da imaju abnormalan položaj krila i redukovanu sposobnost letenja i penjanja. Ove mušice su imale abnormalne, „naduvene“ mitohodrije sa smanjenim brojem kristi. Ovakav fenotip su imale i mušice sa inaktiviranim ortolog genima *PINK1* i *DJ-1* gena (Clark i sar., 2006; Park i sar., 2006; Deng i sar., 2008). Povećana produkcija parkin proteina kod ovih mušica je dovela do anuliranja simptoma, dok kod mušica sa inaktivacijom oba proteina nije došlo do ispoljavanja težeih simptoma. Ovakvi nalazi ukazuju na to da ova dva proteina svoju funkciju ostvaruju u linearnom putu, gde parkin deluje nizvodno od PINK1 proteina. Prekomerna produkcija DJ-1 proteina je takođe u nekoj meri ublažavala simptome izazvane nedostatkom PINK1 proteina, ali nije imala uticaja na simptome izazvane deficitom parkin proteina, što ukazuje da DJ-1 protein takođe deluje nizvodno od PINK1 proteina, ali u signalnom putu paralelnom sa parkinom. Ovi nalazi su u izvesnoj meri potvrđeni i u dopaminergičkim neuronima (Park i sar., 2006).

Uloga ovog funkcionalnog PINK1/Parkin puta je proučavana u velikom broju studija. Jedna od uloga ovog kompleksa je u održavanju homeostaze mitohondrija. U normalnom stanju ćelije mitohondrijska dinamika je usmerena u pravcu promocije fisije mitohondrija, dok u uslovima smanjene energije ili većim potrebama za energijom, u smeru intenzivnijeg povezivanja ovih organela (fuzije), što može predstavljati protektivni mehanizam u suočavanju ćelije sa energetsom krizom (Mortiboys i sar., 2008). Studije na vinskih mušicama i ćelijama sisara su pokazale da PINK1/Parkin signalni put dovodi do ubikvitinacije i proteozomalne degradacije mitofuzina, proteina koji se nalazi na spoljašnjoj membrani mitohondrija i koji promoviše fuziju mitohondrija. Na taj način se štiti mitohondrijska mreža od fuzije sa disfunkcionalnim mitohondrijama koje treba odstraniti (Tanaka i sar., 2010; Ziviani i sar., 2010). Pretpostavlja se da Parkin vrši ubikvitinaciju i

time aktivira ubikvitin-proteazomni sistem za čitavu seriju proteina koji se nalaze na spoljašnjoj membrani mitohondrija. Na taj način, dolazi do rupture mitohondrijske membrane i, kao sekundarni proces, do autofagije osštećene organele. Može se reći da PINK1/Parkin signalni put vrši pripremu mitohondrije za mitofagiju, ali ne i da indukuje sam proces razgradnje (Ding i sar., 2010).

Još jedna uloga PINK1/Parkin kompleksa je u održavanju homeostaze kalcijuma (Gandhi i sar., 2009). U prilog tome govori podatak da je abnormalna regulacija nivoa kalcijuma posebno štetna za adultne dopaminergičke neurone u SN, u poređenju sa mnogo manje osetljivim neuronima u ventralnoj tegmentnoj regiji. Objašnjenje ovakve pojave je u tome što dopaminergički neuroni u SN svoju ritmičku aktivnost obavljaju upravo putem kalcijumovih kanala, a ne natrijumovih, više nego drugi dopaminergički neuroni (Chan i sar., 2007). Prekomerna produkcija mutiranog Parkin proteina u humanim neuroblastoma ćelijskim linijama je posredno dovodila do smanjenja bazalne koncentracije kalcijuma u ćeliji i time ove ćelije činila osetljivijim na neurotoksin 6-hidroksi dopamin koji dovodi do parkinsonih simptoma. Nemutirani Parkin protein nije pokazivao uticaj na koncentraciju kalcijuma u ćeliji, tako da je postavljena mogućnost da mutirani Parkin protein ispoljava i efekte koji su karakteristični za dominantno nasleđivanje, a ne samo gubitak funkcije koji je tipičan za recesivni način nasleđivanja (Sandebring i sar., 2009).

Danas je potvrđeno da uloga Parkina kao E3 ubikvitin-ligaze nije jedina funkcija ovog proteina. Jedna od funkcija je asocirana sa prisustvom Parkina u nukleusu, gde predstavlja represor transkripcije p53 gena. Parkin fizički intereaguje sa promotorom ovog gena preko RING1 domena i redukuje transkripciju čime smanjuje nivo p53 proteina (Da Costa i sar., 2009). Ovaj protein može imati uticaja u ćelijskoj smrti u nekoliko potencijalnih puteva patogeneze PB, jer je pokazano da smanjenje ekspresije p53 gena sprečava ćelijsku smrt izazvanu MPTP-om ili 6-hidroksi dopaminom (Duan i sar., 2002). U saglasnosti sa ovim nalazima je pokazano da prisustvo mutacija u *Parkin* genu koje dovode do deficita proteina i simptoma PB je u korelaciji sa višim nivoom p53 proteina u mišijim i ljudskim mozgovima. Ovo ukazuje da i procesi zavisni od p53 proteina mogu doprinostiti patogenezi PB (Da Costa i sar., 2009).

Imajući u vidu da je alfa-sinuklein u Levijem telima obeležen većom količinom ubikvitina, a da je Parkin E3 ubikvitinaza, postojala je ideja da ova dva proteina direktno interaguju. Danas je pokazano u različitim model sistemima (vinska mušica, glodari, neuronima-slične ćelijske linije) da Parkin ne interaguje direktno sa alfa-sinukleinom, ali da prekomerna produkcija Parkin proteina ima protektivnu ulogu u odnosu na štetan uticaj alfa-sinukletina (Kim i sar., 2003; Lo Bianco i sar., 2004; Haywood i sar., 2006).

*In vitro* studije na ćelijskim linijama SH-SY5Y sa utišanim *Parkin* genom su pokazale povećan stepen apoptoze, kao i veći nivo autooksidovanog dopamina, ukazujući da parkin protein može imati značajna antioksidativna svojstva (Machida i sar., 2005).

#### **1.4.3.2. Ostale forme autozomno-recesivne Parkinsonove bolesti**

##### ***PARK6 / PINK1* gen**

*PARK6* lokus je prvi put mapiran 2001. godine kod velike italijanske porodice sa autozomno-recesivnom PB ranog početka, u okviru koje je utvrđeno ukrštanje u srodstvu (Valente i sar. 2001, Valente i sar., 2004). Ubrzo je u okviru mapiranog lokusa 1p35-p36 identifikovan gen *PINK1* (*fosfataza i tenzin homolog (PTEN)-indukovana kinaza 1*) odgovoran za nastanak bolesti. *PINK1* mutacije su uzrok između 1% i 3% slučajeva PB ranog početka u Evropi (Valente i sar., 2004; Rohe i sar., 2004; Healy i sar., 2004; Bonifati i sar., 2005), 2,5% u studijama na kineskoj, malajskoj i indijskoj populaciji (Hatano i sar., 2004; Tan i sar., 2005), i čak 8,9% u japanskim porodicama sa autozomno-recesivnom PB (Li i sar., 2005). Godine početka bolesti kod bolesnika sa *PINK1* mutacijama su najčešće između četvrte i pete decenije, ali se tok bolesti ne razlikuje od PB kasnog početka, sa sporom progresijom, odličnim odgovorom na levodopu i pojavom demencije u nekim slučajevima (Valente i sar., 2001; Hatano i sar., 2004; Bonifati i sar., 2005; Tan i sar., 2006). Postoje podaci koji ukazuju da heterozigotni nosioci mutacija u *PINK1* genu imaju veći rizik za razvoj PB (Valente i sar., 2004; Djarmati i sar., 2006; Brooks i sar., 2009). U prilog tome govori otkiće da heterozigoti za *PINK1* mutacije imaju 20-30% smanjenu

apsorpciju 18F-dopa u putamenu i kaudatusu u poređenju sa kontrolama (Khan i sar., 2002).

*PINK1* je lociran na hromozomu 1, obuhvata 8 egzona i kodira za protein koji se sastoji od 581 amino kiseline. Ovaj protein poseduje serin/treonin kinazni domen i lociran je u mitohondrijskom matriksu i intermembranskom prostoru (Silvestri i sar. 2005). Funkcija *PINK1* proteina nije u potpunosti objašnjena, ali je pokazano da se ovaj protein u slučaju depolarizacije mitohondrijske membrane akumulira na spoljašnjoj membrani i reguliše tj. aktivira funkciju Parkin proteina (Clark i sar., 2006).

Do danas je otkriveno nekoliko mutacija promenjenog smisla i promene okvira čitanja, dok je velika homozigotna delecija otkrivena samo u jednoj porodici (Li i sar. 2005). Većina potvrđenih mutacija pogađa visoko konzervirane amino kiseline u kinaznom domenu proteina što dovodi do narušavanja njegove aktivnosti. *In vitro* studije su pokazale da ćelije sa mutiranim *PINK1* proteinom imaju povećanu osetljivost na oksidativni stres (Abou-Sleiman i sar., 2006).

### ***PARK7 / DJ-1 gen***

Prve autozomno-recesivne mutacije u *DJ-1* genu su detektovane u dve evropske porodice sa PB ranog početka (između 20 i 40 godina) (Bonifati i sar., 2003). Gen je mapiran na hromozomu 1p36.23, obuhvata 7 egzona i kodira za protein koji se sastoji od 189 aminokiselina (Nagakubo i sar., 1997; Bonifati i sar., 2003a). Ovaj protein pripada C56 familiji proteina i kao homodimer je lociran u citoplazmi, ali može da se translocira u mitohondrije i najverovatnije ima ulogu antioksidanta (Nagakubo i sar., 1997; Abou-Sleiman i sar., 2003; Canet-Aviles i sar., 2004; Moore i sar., 2005). Ova moguća funkcija je posebno bitna u nigralnim dopaminskim neuronima koji su izloženi visokim nivoima oksidativnog stresa.

Mutacije u *DJ-1* genu koje dovode do nastanka PB su izuzetno retke i samo nekoliko bolesnika sa ovim mutacijama je do sada opisano (Bonifati i sar., 2003; Hague i sar., 2003; Hering i sar., 2004), tako da postoji jako malo podataka o kliničkoj prezentaciji,

neuropatologiji i genotipsko-fenotipskoj korelaciji za ovaj oblik PB. Pored parkinsonih simptoma opisani su i psihijatrijski simptomi kod nosilaca mutacija (Dekker i sar., 2003). Pokazano je da homozigotne ili složene heterozigotne mutacije dovode do gubitka funkcije proteina tako što narušavaju njegovu strukturu vodeći ka destabilizaciji, nemogućnosti formiranja dimera i smanjenju antioksidativne aktivnosti (Takahashi-Niki i sar., 2004; Anderson i sar., 2008; Malgieri i Eliezer, 2008).

Iako su *DJ-1* mutacije izuzetno retke čak i u PB ranog početka, studije su pokazale da DJ-1 protein ima bitnu ulogu u nastanku sporadične PB kasnog početka. U studiji Mura i saradnika je pokazano da mutirani DJ-1 protein intereaguje sa Parkinom, što ukazuje da su ovi proteini uključeni u isti put patogeneze i da je DJ-1 protein supstrat za delovanje Parkina kao E3 ligaze (Moore i sar., 2005).

#### **1.4.4. Autozomno-recesivne forme atipičnih parkinsonizama**

Mutacije u nekoliko gena mogu da dovedu do neurodegeneracije sa vrlo ranim, čak juvenilnim početkom, najčešće sa brojnim drugim simptomima pored parkinsonizma.

Homozigotne ili složene heterozigotne mutacije u genu *ATP13A2* (*ATPaza 13A2*) dovode do nastanka autozomno-recesivnog atipičnog parkinsonizma, Kufor-Rakebovog sindroma (Ramirez i sar., 2006). Ovaj sindrom se karakteriše juvenilnim, brzo progresivnim parkinsonizmom sa dobrim odgovorom na levodopu, piramidalnim znacima, demencijom i parezom pogleda. *ATP13A2* je velik gen koji se sastoji od 29 egzona i kodira lizozomni membranski transportni protein sa ATPaznom funkcijom (Ramirez i sar., 2006). Oko 10 patogenih tačkastih mutacija je do sada opisano u homozigotnom ili složenom heterozigotnom stanju koje na direktan ili indirektan način pogađaju transmembranske domene proteina i dovode do nastanka nestabilnih formi proteina koje se razgrađuju proteozomnim sistemom. Do sada nisu opisane delecije ili duplikacije egzona kao ni multiplikacije čitavog gena. Nedavno je opisana porodica sa *ATP13A2* mutacijama i

patološki potvrđenom ceroidnom lipofuscinozom, a slična patologija je opisana i kod pasa nosilaca mutacija u homologu ovog gena (Bras i sar., 2012).

Mutacije u *PLA2G6* genu koji kodira protein fosfolipazu A2 grupe 6, su identifikovane kod bolesnika sa ranim početkom bolesti koja se manifestuje distonija-parkinsonizmom koji pokazuje dobar odgovor na levodopu, piramidalnim znacima i kognitivnim i psihijatrijskim simptomima. Magnetna rezonanca ovih bolesnika je pokazala atrofiju mozga sa i bez akumulacije gvožđa, a patološki nalazi su pokazali široku rasprostranjenost Levijevih tela (Paisan-Ruiz i sar., 2012), što ukazuje na povezanost sa tipičnom PB. Interesantno je da su mutacije u ovom genu najpre opisane kod bolesnika sa infantilnom neuroaksonalnom distrofijom i neurodegeneracijom asociranom sa akumulacijom gvožđa u mozgu.

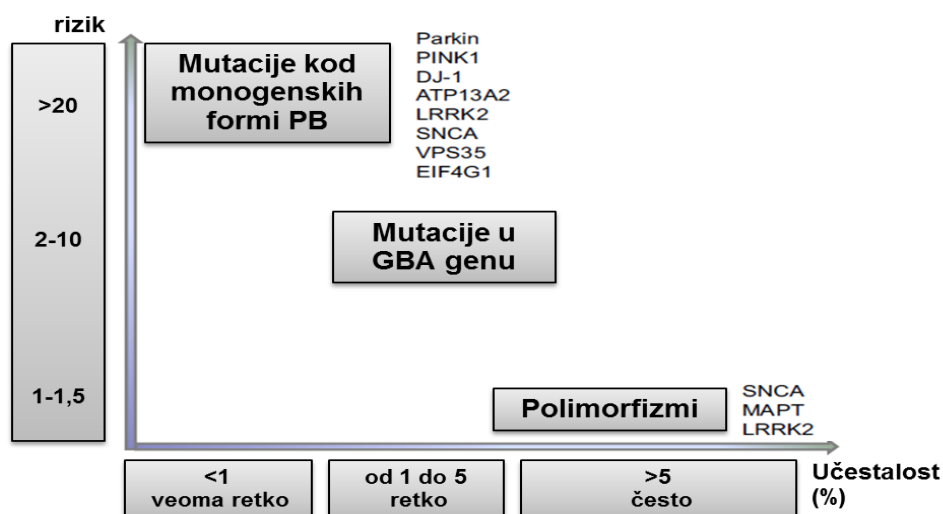
*FBOX7* gen (eng. *F-box only protein 7*) je identifikovan u iranskoj porodici sa autozomno-recesivnim, predominantnim piramidalnim znacima i juvenilnim parkinsonizmom (Shojaee i sar. 2008), a zatim su mutacije u ovom genu pronađene u italijanskim i holandskim porodicama sa juvenilnim parkinsonizmom koji pokazuje variranja u odgovoru na levodopu (Di Fonzo i sar. 2009). *FBOX7* gen kodira dve izoforme proteina koje su deo ubikvitin-ligaza kompleksa, ali funkcije ovih proteina još uvek nisu utvrđene. Koristeći ribe zebrice (lat. *Danio rerio*) kao animalni model, pokazano je da *PARK15* pokazuje karakteristike PB, uključujući gubitak dopaminergičkih neurona i dopamin zavisni motorni deficit (Zhao i sar., 2012). Patologija bolesnika sa mutacijama u *FBOX7* genu je još uvek nepoznata, ali je pokazana *FBOX7* imunoreaktivnost u Levijevim telima kod tipične PB, kao i citoplazmatskim inkluzijama kod multiple sistemske atrofije, ukazujući na uključenost ovog proteina u patogenezi sinukleinopatija (Zhao i sar. 2013).

Dva najskorije identifikovana gena za koje je pokazano da mutacije u njima dovode do autozomno-recesivnih juvenilnih parkinsonizama su *DNAJC6* i *SYN1*. Mutacije u *DNAJC6* genu su otkrivene u jednoj palestinskoj porodici (Edvardson i sar., 2012), a zatim potvrđene i u nesrodnoj turskoj porodici (Koroglu i sar., 2013). Ovaj gen kodira protein auksilin koji ima ulogu u recikliranju sinaptičkih vezikula. Homozigotna mutacija

p.Arg258Gln u genu *SYN1* je detektovana nezavisno u dve porodice iranskog i italijanskog porekla (Krebs i sar., 2013; Quadri i sar., 2013). Interesantno je da ovaj gen kodira protein sinaptojanin 1 koji ima veoma sličnu ulogu kao i auksilin.

#### 1.4.5. Genetički faktori rizika

Već je istaknuto da su monogenske forme PB veoma retke i da većina slučajeva bolesti nastaje iz kompleksne interakcije između genetičkih faktora i faktora spoljašnje sredine. Genetički faktori rizika tj. predispozicije za nastanak bolesti koji su do danas identifikovani i potvrđeni meta analizama su polimorfizmi u genima *SNCA*, *MAPT* i *LRRK2*, kao i mutacije u *GBA* genu (Slika 8.)(Tan, 2007).



Slika 8. Efekat genetičkih faktora rizika za nastanak PB u funkciji njihove učestalosti. Genetički faktori imaju mali uticaj na rizik za nastanak bolesti u većini slučajeva. Najveći uticaj imaju u nastanku retkih monogenih formi PB. Detaljnija objašnjenja su u tekstu. Modifikovano prema Lesage i Brice, 2012.

Geni *SNCA* i *LRRK2* su poznati uzročnici autozomno-dominantne PB, što je napred i opisano. Pored toga je utvrđeno da pojedine varijante tj. polimorfizmi u ovim genima nezavisno povećavaju rizik za nastanak bolesti (Slika 8). Dva polimorfizma (G2385R i R1628P) u *LRRK2* genu koja su česta u azijskim populacijama su potvrđeni kao faktori

rizika za PB (Di Fonzo i sar., 2006b; Ross i sar., 2008), dok su polimorfizmi u promotoru *SNCA* gena asocirani sa bolešću analizama haplotipova.

Polimorfizmi u *MAPT* genu, koji kodira mikrotubularni protein tau, su asocirani najpre sa pojavom progresivne supranuklearne paralize (PSP), kao i Alchajmerove bolesti. U novijim studijama je pokazano da H1 haplotip ovog gena, koj predstavlja jedan od dva česta haplotipa kod belaca, povećava rizik za nastanak PB (odnosi šansi ~1,5) (Wider i sar., 2010).

Genetički faktor rizika koji, prema sadašnjim saznanjima, najviše utiče na nastanak PB jesu heterozigotne mutacije u *GBA* genu, što se može videti na grafikonu prikazanom na Slici 8. i detaljnije je opisano u sledećem poglavlju.

#### **1.4.5.1.        *GBA* gen**

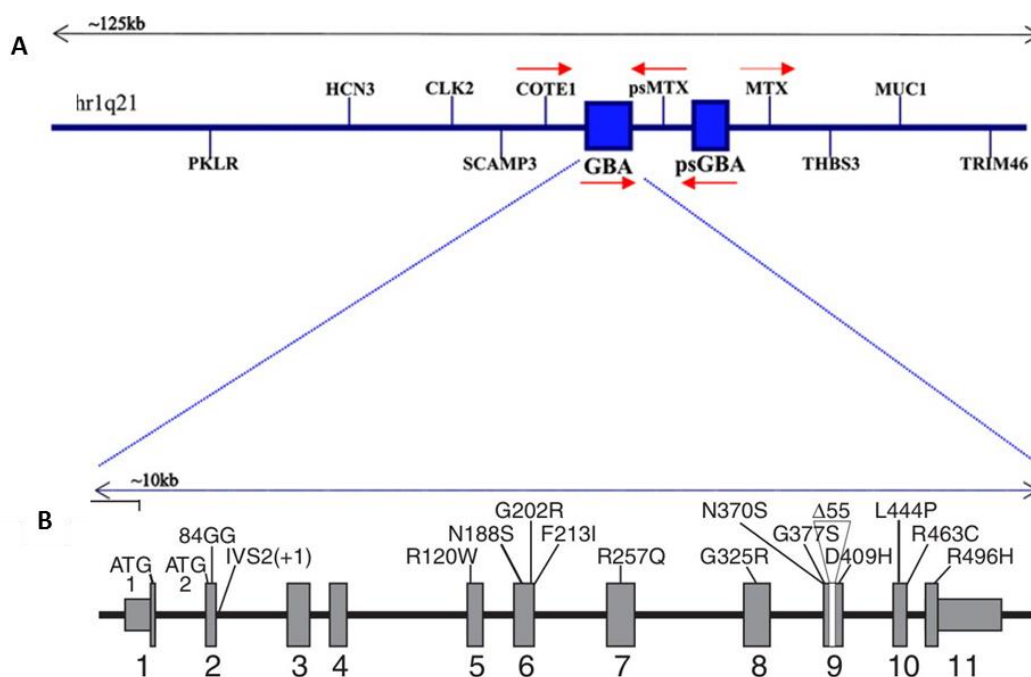
*GBA* gen kodira enzim glukocerebrozidazu i homozigotne i složene heterozigotne mutacije u ovom genu dovode do nastanka Gošeove bolesti (GB). GB je retko, pan-etničko, autozomno-recesivno oboljenje, koje predstavlja najčešći poremećaj lizozomnog skladištenja. Kod ove bolesti dolazi do akumulacije glukocerebrozida u tkivima zbog gubitka enzima glukocerebrozidaze, što se ispoljava spektrom kliničkih simptoma. Tradicionalno je GB podeljena na tri tipa: tip I predstavlja ne-neuropatsku formu bolesti, dok su tip II i tip III akutna i hronična forma bolesti. Zapravo se može reći da GB predstavlja kontinuum fenotipova koji obuhvataju neneuropatske i neuropatske forme (Sidransky, 2004).

Asocijacija mutacija u *GBA* genu i PB je najpre ustanovljena u longitudinalnim kliničkim studijama, gde je primećeno da jedan broj bolesnika sa GB razvija i parkinsonse simptome sa odgovarajućim patohistološkim promenama (Tayebi i sar., 2001; Bembi i sar., 2003). Zatim je utvrđeno i da je PB mnogo češća kod srodnika prvog stepena obolelih od GB, koji su heterozigotni nosioci mutacija u *GBA* genu. Ova otkrića su inicirala prve analize *GBA* gena kod bolesnika sa PB.



## Pozicija i struktura *GBA* gena

*GBA* gen je lociran na hromozomu broj jedan, na poziciji 1q21 i obuhvata 7.6kb koje uključuju 11 egzona. Visoko homologni pseudogen je lociran 16kb nizvodno od *GBA* gena (Slika 9.). Usled blizine i visoke sličnosti između gena i pseudogena, moguća je nehomologa rekombinacija i genska konverzija između njih. Jedan deo mutacija u *GBA* genu, pogotovu mutacije u okviru kompleksnih mutiranih alela, su nastale na ovaj način i procenjuje se da ovi kompleksni aleli zapravo nose oko 20% patogenih mutacija u *GBA* genu (Hruska i sar., 2008).



Slika 9. Šematski prikaz pozicije i strukture *GBA* gena. A – šematski prikaz položaja i orijentacije *GBA* gena i pseudogena. B – šematski prikaz egzona (označeni brojevima ispod sivih pravougaonika) i najčešće mutacije sa naznačenom lokacijom u egzonima (označene uobičajnim nazivom aminokiselinske promene). Modifikovano prema Hruska i sar., 2008.

## Mutacije u *GBA* genu

Prema ustaljenoj *GBA* nomenklaturi se brojem jedan označava prva aminokiselina u proteinu posle signalnog peptida od 39 aminokiselina, dok se prema HGVS preporukama,

prvi ATG kodon označava brojem jedan (URL: <http://www.hgvs.org/mutnomen/>) (den Dunnen i Antonarakis, 2000).

Skoro 300 različitih mutacija u *GBA* genu je identifikovano do danas kod bolesnika sa GB, i to su pre svega tačkaste mutacije, zatim male insercije i delecije, kao i kompleksni aleli nastali rekombinacijom ili genskom konverzijom između *GBA* gena i pseudogena. Mutacije u *GBA* genu se nalaze u svim kodirajućim regionima, ali su najčešće u delu koji kodira COOH-terminalni domen proteina sa katalitičkom funkcijom (Lesage i sar., 2011a). *GBA* mutacije se klasifikuju kao blage ukoliko dovode do nastanka GB tip I, ili kao teške ukoliko dovode do nastanka GB tip II ili III (Beutler i sar., 2005).

U autopsijskim studijama pokazano je da je učestalost *GBA* mutacija veća kod bolesnika sa patohistološki potvrđenom PB, pogotovu kod bolesnika sa PB ranog početka, u odnosu na kontrole bez patohistoloških nalaza karakterističnih za PB (Lwin i sar., 2004; Eblan i sar., 2005). Ovakvi nalazi su potvrđeni u brojnim istraživanjima, pre svega kod bolesnika sa PB u populaciji Aškenazi Jevreja koji imaju najvišu učestalost *GBA* mutacija, ali i kod bolesnika sa PB i demencijom sa Levijevim telima u drugim populacijama, i sve ove nezavisne studije su pokazale da prisustvo jednog ili dve mutirana *GBA* alela predstavlja najučestaliji faktor rizika za razvoj alfa-sinukleinopatija, pre svega PB ranog početka (Eblan i sar., 2005; Sato i sar., 2005; Clark i sar., 2007; Gan-Or i sar., 2008; Nichols i sar., 2009; Lesage i sar., 2011b) i demencije sa Levijevim telima (Goker-Alpan i sar., 2006; Mata i sar., 2008; Clark i sar., 2009; Farrer i sar., 2009). Velika meta-analiza koja je obuhvatila podatke genotipizacije *GBA* gena iz 16 centara iz Amerike, Evrope, Izraela i Azije je definitivno potvrdila ulogu heterozigotnih mutacija u *GBA* genu u predispoziciji za nastanak PB (Sidransky i sar., 2009).

Nosioi *GBA* mutacija imaju širok spektar fenotipa, od klasične PB ranog početka sa dobrim odgovorom na levodopu, do kliničkih prezentacija koje odgovaraju demenciji sa Levijevim telima.

## **Ekspresija i funkcija *GBA* gena**

Enzim glukocerebrozidaza, kodiran *GBA* genom, lociran je u lizozomima i razlaže glikolipidne glukocerebrozide na glukozu i ceramide. Mutacije u *GBA* genu dovode do nedostatka enzima glukocerebrozidaze, i samim tim do akumulacije nedegradovanog supstrata, glukocerebrozida, u lizozomima ćelija retikulo-endotelijalnog sistema (makrofaga). Glavna biološka funkcija ovih ćelija je fagocitozom posredovano razlaganje ostarelih ćelija koje imaju membrane bogate glukocerebrozidima (eritrociti). Ove makrofage se nazivaju “Gošeeve ćelije” i najviše se nalaze u slezini, jetri i koštanoj srži, dovodeći do inflamacije i organomegalije (Sidransky, 2012).

Novije studije sa neuroimidžingom su pokazale da PB bolesnici sa *GBA* homozigotnim, ali i heterozigotnim mutacijama imaju presinaptičku dopaminergičku neuronalnu disfunkciju (Kono i sar., 2007), kao i da se u mozgu ovih bolesnika nalazi raširena alfa-sinukleinska patologija, kao i patologija Levijevih tela u neokorteksu (Neumann i sar., 2009).

Mehanizam kojim ove mutacije dovode do povećanja rizika za nastanak PB još uvek nije u potpunosti objašnjen, ali se pretpostavlja da uključuje lizozomnu funkciju, ubikvitin proteazomni sistem, kao i metabolizam lipida u odstranjivanju alfa-sinukleina (DePaolo i sar., 2009). Ovi putevi razgradnje i njihova asocijacija sa patogeneom PB će biti detaljnije opisani u narednom poglavlju.

## **1.5. Patogeneza Parkinsonove bolesti**

PB se karakteriše kako kliničkom, tako i etiološkom heterogenošću. Pored toga, i autopsijski nalazi pokazuju određene razlike među različitim genetički uslovljenim formama PB, kao i u slučajevima sporadične PB (Corti i sar., 2011).

Patološki nalazi u najvećem broju slučajeva PB ukazuju na progresivnu degeneraciju i izumiranje dopaminergičkih neurona pars compacta substantiae nigrae mezencefalona, kao i akumulaciju alfa-sinukleina u zahvaćenim neuronima i formiranje

Levijevih tela (Tofaris, 2012). Kod PB nastale usled mutacija u SNCA genu, autopsijski nalazi ukazuju na rašireno prisustvo Levijevih tela i neurita (Duda i sar., 2002; Zarranz i sar., 2004; Seidel i sar., 2010), dok se u slučaju PB uzrokovane mutacijama u *LRRK2* genu Levijeva tela javljaju u velikom broju slučajeva, ali ne u svim (Zimprich i sar., 2004). Nasuprot tome, kod autozomno recesivnih formi PB koje nastaju usled mutacija u *Parkin*, *PINK1* i *DJI* genima, prisustvo Levijevih tela je autopsijski potvrđeno kod svega nekoliko slučajeva (Shimura i sar., 1999; Samaranch i sar., 2010).

Molekularni mehanizam dejstva alfa-sinukleina na ćelije još uvek nije u potpunosti razjašnjen, iako su istraživanja pokazala da može dovesti do nastanka pora u ćelijskoj membrani (Volles i sar., 2001), kao i do prekida komunikacije između endoplazmatičnog retikuluma i Goldžijevog aparata (Vekrellis i sar., 2004). Akumulacija alfa-sinukleina može biti uzrok i oštećenju lizozoma, kao i mitohondrija, a sa druge strane vodi ka oštećenju citoskeleta što za posledicu ima aksonalnu degeneraciju i poremećenu funkciju sinapsi. Svi ovi procesi, nastali usled nagomilavanja alfa-sinukleina u neuronima, dovode do njihove degeneracije i smrti (Xilouri i Stefanis, 2011).

Akumulacija proteina koji su nepravilne konformacije je česta pojava u neurodegenerativnim bolestima i najčešće su posledica kompromitovanog nekog od sistema razgradnje proteina. Dva najznačajnija sistema razgradnje proteina u ćeliji su: ubikvitin-proteazomni sistem (UPS) i autofagno-lizozomni sistem. Autofagno-lizozomni sistem obuhvata autofagiju posredovanu šaperonima (CMA, eng. *chaperone mediated autophagy*) i makroautofagiju (Xilouri i Stefanis, 2011).

### **1.5.1. Ubikvitin-proteazomni sistem (UPS) razgradnje u Parkinsonovoj bolesti**

Prilikom razgradnje proteina UPS-om dolazi najpre do ubikvitinacije, odnosno kovalentnog vezivanja nekoliko molekula ubikvitina za protein. U ovom koraku uzastopno deluju tri enzima: E1- koji aktivira ubikvitin, E2- koji ga transportuje i E3- koji vrši ligaciju

ubikvitina i supstrata. Supstrat obeležen ubikvitinom je prepoznat od strane 26S proteazoma koji vrši proteolizu. U Levijevim telima dolazi do nakupljanja proteina obeleženih ubikvitinom, ali je osnovna dilema da li je to ipak sekundarna pojava nastala zbog nemogućnosti ubikvitin-proteazomnog sistema da razgradi supstrat ili sami aberantni proteini imaju tendenciju da formiraju agregate. U prilog uticaja ovog sistema na nastanak PB govore i mutacije u genima koji kodiraju komponente UPS-a, a koje dovode do genetičkih formi PB. Jedan od gena je *PARK2* koji, kao što je već rečeno, kodira ubikvitin ligazu, jednu od komponenti E3 ubikvitin ligaznog kompleksa. Drugi gen potencijalno asociran sa PB je *UCH-L1* koji kodira protein čija je funkcija oslobađanje ubikvitina iz kompleksa kako bi mogao ponovo da vrši ubikvitinaciju nekog drugog supstrata (Kabuta i sar., 2008).

### **1.5.2. Lizozomno-zavisni putevi razgradnje u Parkinsonovoj bolesti**

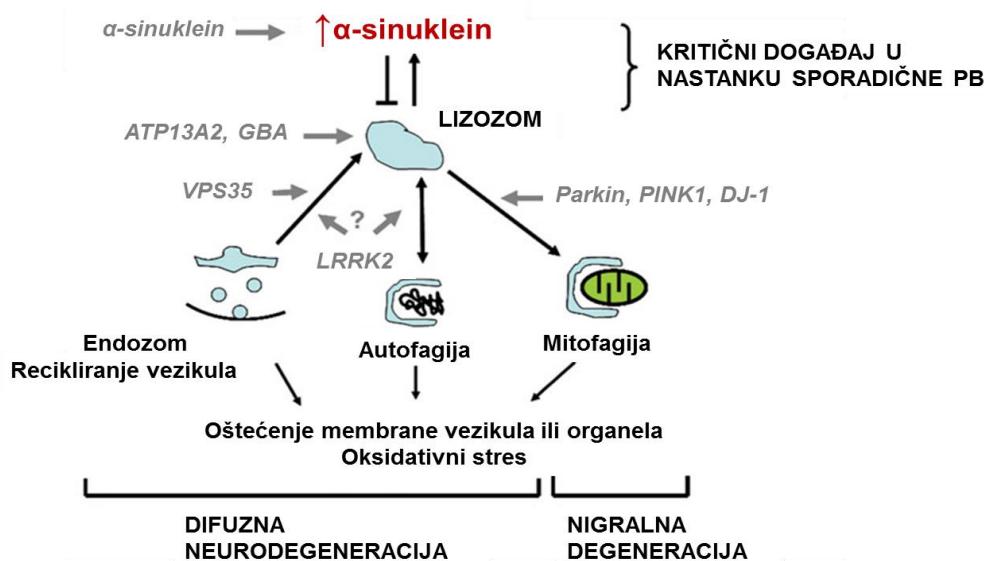
Najpre se smatralo da je UPS glavni mehanizam razgradnje alfa-sinukleina, ali je pokazano u *in vitro* studijama da je alfa-sinuklein dobar supstrat za lizozomne puteve razgradnje jer poseduje pentapeptidni niz neophodan za pokretanje CMA. Na osnovu saznanja o vezi alfa-sinukleina i CMA, postavljena je hipoteza da smanjenje funkcije ovog sistema dovodi do nagomilavanja alfa-sinukleina koje vodi ka PB (Tofaris, 2012) (Slika 10.).

Prema ovom potencijalnom mehanizmu, pri nastanku sporadične PB neophodan je kritičan nivo alfa-sinukleina u neuronima da bi se pokrenuo kaskadni proces, najverovatnije remeteći transport do lizozoma ili samu funkciju lizozoma. Slični procesi se pokreću i kao posledica mutacija koje imaju ulogu u nastanku PB, ali fenotip zavisi od uloge koju mutirani protein ima u kaskadnom procesu.

Jedan od puteva uključuje Parkin, PINK1 i DJ1 proteine koji održavaju mitohondrijsku homeostazu i integritet i koji predstavljaju kritične regulatore mitofagije,

procesa koji obuhvata razgradnju oštećenih mitohondrija u lizozomima i koji je od velikog značaja u nigralnim dopaminergičkim neuronima (Tofaris, 2012). Imajući u vidu da mutacije u ovim genima utiču samo na jedan aspekt lizozomne funkcije, patološki su ograničene na nigrostrijatalni sistem, dok klinički obuhvataju pretežno motorni fenotip.

Povezanost najučestalijeg genetičkog uzroka PB, mutacija u *LRRK2* genu, i lizozomnih puteva razgradnje nije još u potpunosti rasvetljena. Pretpostavljeno je da *LRRK2* protein i svojom ulogom u regulaciji citoskeleta utiče na autofagiju i endozomni transport (Slika 10.).



Slika 10. Šematski prikaz potencijalnog puta patogeneze u PB koji objedinjuje autozomno-recesivne i autozomno-dominantne gene. Detaljnija objašnjenja su u tekstu. Modifikovano prema Tofaris, 2012.

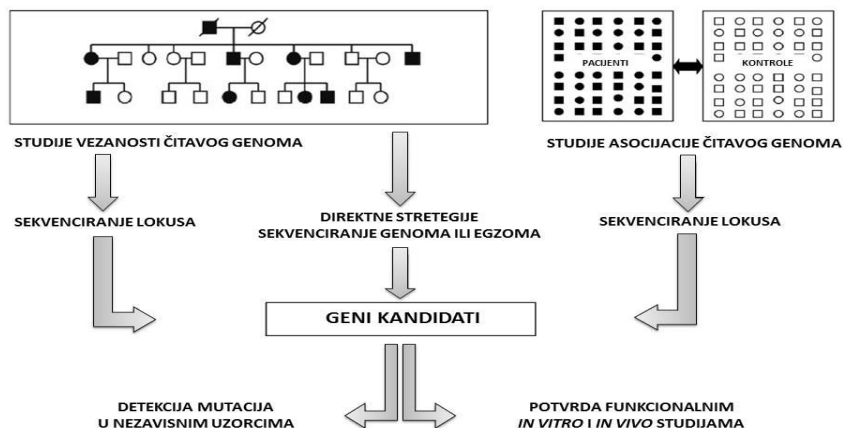
Pored toga, otkiće mutacija u genima *ATP13A2* i *GBA* koji kodiraju lizozomane enzime, kao i mutacije u genu *VPS35* koji kodira protein uključen u lizozomno-endozomni transport, i njihova uloga u nastanku PB, su pružile dodatne dokaze u prilog teoriji da lizozomi imaju centralnu ulogu u patogenezi PB i da lizozomni putevi razgradnje mogu predstavljati vezu između različitih puteva patogeneze u PB (Tofaris, 2012) (Slika 10.).

Ono što još uvek nije razjašnjeno je uloga autofagije u neurodegeneraciji, odnosno da li je autofagija protektivan mehanizam ili doprinosi oštećenju i smrti ćelije. U pojedinim

studijama je pokazano da stimulacija autofagije dovodi do razgradnje alfa-sinukleina i većeg preživljavanja neurona, dok je u drugim studijama pokazano upravo suprotno i objasnjenje ovakvih razlika bi bilo da je autofagija protektivna u ranim fazama neurodegeneracije, dok prekomerna indukcija autofagije u kasnijim fazama može da dovede do smrti neurona (Xilouri i Stefanis, 2011).

## 1.6. Nove strategije istraživanja u genetici PB

Od otkrića gena za alfa-sinuklein, istraživanja genetičke osnove PB su postala veoma intenzivna i dinamična, a istraživački pristupi su se vremenom menjali kako sa napretkom tehnologija, tako i sa promenama fokusa samih istraživanja. Najveći skok na polju genetičkih istraživanja je napravljen primenom sistematskog skrininga čitavog humanog genoma bez *a priori* hipoteze o ulozi određenog gena u mehanizmu koji dovodi do nastanka PB. Dva osnovna pristupa na kojima su ovakva istraživanja sprovedena su nivo porodica i populacioni nivo (Slika 11).



Slika 11. Šematski prikaz trenutnih strategija istraživanja u identifikaciji gena asociраних sa PB. Modifikovano prema Bonifati, 2014.

Tradicionalni pristup, baziran na studijama vezanosti čitavog genoma (eng. *genome-wide linkage*) u velikim porodicama sa višegeneracijskom prezentacijom bolesti je doveo do identifikacije najvećeg broja monogenских formi PB: *SNCA*, *LRRK2*, *EIF4G1*, *Parkin*, *PINK1*, *DJ-1*, *ATP13A2*, *PLA2G6*, *FBOX07* (Polymeropoulos i sar., 1997; Kitada i sar., 1998; Bonifati i sar., 2003; Ramirez i sar., 2004; Valente i sar., 2004; Zimprich i sar., 2004; Paisan-Ruiz i sar., 2004; Shojaei i sar., 2008; Di Fonzo i sar., 2009; Paisan-Ruiz i sar., 2009; Chartier-Harlin i sar., 2011).

Ovakav pristup, praćen pozicionim kloniranjem i skriningom lokusa od interesa, se pokazao kao veoma uspešan u identifikaciji visoko penetrantnih patogenih mutacija koje direktno dovode do razvoja bolesti. Ograničenje ovog pristupa u slučaju PB, imajući u vidu da je u pitanju bolest kasnog početka, je dostupnost DNK uzoraka u više generacija obolelih i zdravih članova velikih porodica. Pored toga, kod PB pravo Mendelovsko nasleđivanje je veoma retko, tako da su i velike porodice, pogodne za analizu, retko dostupne. Dalja ograničenja predstavljaju pojava nepotpune penetrantnosti mutacija, različite kliničke slike, pa i patološke prezentacije, kao i postojanje fenomena fenokopija (Bonifati, 2007). Uprkos svim navedenim ograničenjima i činjenici da ovakav pristup može da objasni samo mali broj familijarnih formi PB, pomoću njega su identifikovani učesnici u molekularnim procesima koji dovode do patogeneze PB. Nedavna otkrića *DNAJC6* i *SYNJ1* gena pokazuju da studije vezanosti imaju svoj značaj i u eri tehnologije sekvenciranja sledeće generacije (Edvardson i sar., 2012; Koroglu i sar., 2013; Krebs i sar., 2013; Quadri i sar., 2013).

U poslednjih pet godina veliki broj istraživanja je urađen primenom studija asocijacije u čitavom genomu (eng. *genome-wide association studies* (GWAS)), sa ciljem utvrđivanja genetičkih varijanti koje su relativno česte u populaciji i imaju mali efekat na razvoj bolesti ili modifikuju rizik za razvoj PB. Do sada je identifikovano preko 20 lokusa za koje se pretpostavlja da mogu uticati na patogenezu PB, dok se očekuje da će se meta analizama većeg broja GWAS doći i do novih lokusa od interesa (Singleton i sar., 2013). Varijante koje se detektuju ovim pristupom ne mogu se koristiti u kliničke dijagnostičke svrhe ili kao prediktori bolesti zbog svog malog uticaja na patogenezu, ali su od velikog



značaja za identifikaciju novih, potencijalnih učesnika u mehanizmu nastanka PB. Pored toga, nosioci nekoliko varijanti sa malim uticajem mogu imati veći rizik za nastanak PB usled kumulativnog efekta ili sinergije ovih varijanti.

Uprkos očekivanjima, GWAS pristupom su detektovane promene koje, kao i one detektovane analizama vezanosti, pružaju objašnjenje za mali broj slučajeva PB (Keller i sar., 2012). Na osnovu ovih rezultata dolazi se do zaključka da postoje i različiti tipovi promena koje nisu dovoljno česte da bi bile detektovane GWAS pristupom, a sa druge strane nisu dovoljno penetrantne da bi se detektovale studijama vezanosti u velikim pedigreima.

Nova otkrića genetičke osnove PB su zasnovana na tehnologiji sekvenciranja sledeće generacije (eng. *next-generation sequencing* (NGS)), koja omogućava mnogo veći kapacitet sekvenciranja sa nižim troškovima (Metzker, 2010). Danas su mnoga istraživanja usmerena ka sekvenciranju egzoma koji čini oko 2% čitavog genoma. Upravo ovim pristupom je 2011. godine identifikovana mutacija u genu *VPS35* koja dovodi to tipične PB kasnog početka (Vilarino-Guell i sar., 2011; Zimprich i sar., 2011). Potencijalni problemi ovakvog pristupa su identifikacija patogenih promena i u drugim genima i etička pitanja manipulacije takvim podacima. Sa druge strane, NGS otkriva veliki broj novih potencijalno patogenih promena, ali funkcionalne studije koje bi potvrdile njihovu patogenost nisu u mogućnosti da prate taj trend rasta (Bonifati, 2014).

Nakon otkrića gena u kojima mutacije dovode do nastanka PB, značajan korak predstavlja utvrđivanje učestalosti nađenih mutacija kod bolesnika u različitim populacijama. Na osnovu podataka dobijenih analizama uzoraka različitog etničkog porekla može se utvrditi da li je u pitanju izuzetno retka genetička forma PB, kao što je slučaj sa *PARK17*, ili se radi o široko rasprostranjenoj formi, kao što je *PARK8*. Pored toga, ovakve studije mogu ukazati na populaciono specifične promene, kao i dati bolji uvid u fenotipska ispoljavanja različitih mutacija.

## **2. *Ciljevi rada***

## 2. CILJEVI RADA

U ovom istraživanju su postavljeni sledeći ciljevi:

1. Utvrđivanje distribucije i spektra mutacija u genima *PARK2*, *LRRK2*, *VPS* i *GBA* kod bolesnika sa Parkinsonovom bolešću sa teritorije Srbije.
2. Ispitivanje potencijalnih korelacija između genotipa i fenotipa kod bolesnika sa utvrđenim mutacijama.
3. Formulisanje preporuka za genetičko testiranje bolesnika sa Parkinsonovom bolešću u našoj populaciji.

### **3. *Bolesnici i metode***

## **3. BOLESNICI I METODE**

### **3.1. Ispitanici**

#### **3.1.1. Bolesnici i članovi porodica**

Istraživanjem je obuhvaćeno ukupno 496 bolesnika sa PB koji su se ambulantno ili hospitalno lečili na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije (KCS) u periodu od 2008. do 2014. godine. Ispitivanih bolesnika ženskog pola je bilo 191, dok je muški pol bio zastupljen sa 305 bolesnika.

Bolesnici su registrovani u kompjuterskoj bazi podataka INFOMEDIS pod dijagnozom PB. Dijagnoza je postavljena na osnovu Kriterijuma Britanske Banke mozgova (Hughes i sar., 1992). Svi bolesnici koji su uključeni u istraživanje su detaljno upoznati sa ciljevima istraživanja i potpisali su informisani pristanak o učešću u studiji.

Stadijum bolesti je određen na osnovu Hoehn i Yahrove skale, koja ima 5 stadijuma označenih brojevima od 1 do 5, pri čemu 1. stadijum označava unilateralnu bolest bez aksijalne zahvaćenosti, a 5. stadijum potpuni gubitak autonomije u svakodnevnom funkcionisanju i gubitak kontrole sfinktera (Hoehn i Yahr, 1967).

Dužina trajanja bolesti je definisana kao period od početka prvih simptoma koji se mogu dovesti u vezu sa PB do momenta pregleda, dok su ostali specifični klinički podaci, uključujući pozitivnu porodičnu anamnezu, sistematski prikupljeni na osnovu za ovu priliku dizajniranog upitnika.

U cilju sprovođenja molekularno genetičkih ispitivanja, bolesnicima je punktirano do 10 ml venske krvi. Kao antikoagulans je korišćen natrijum-citrat u koncentraciji 0,38% (w/v) ili EDTA (1,8 mg/1 ml krvi). Uzorci su skladišteni i čuvaju se na -20°C u Laboratoriji za molekularnu i genetičku dijagnostiku neuroloških oboljenja na Klinici za neurologiju, KCS.

Molekularno-genetičke procedure, kao i analiza i interpretacija rezultata vršene su u Laboratoriji za molekularnu i genetičku dijagnostiku neuroloških oboljenja na Klinici za neurologiju, KCS.

Ovo istraživanje, kao i objavljivanje rezultata je odobreno od strane Etičkog odbora KCS (odluka broj:2953/1).

### **3.1.2.       Kontrole**

Kontrolnu grupu je činilo ukupno 510 ispitanika, kojima je takođe uzorkovano 10ml venske krvi za genetičku analizu. Ovi ispitanici su podeljeni u tri podgrupe. U prvoj grupi su bila 143 kontrolna subjekta koji, prema autoanamnezi, nisu međusobno u srodstvu, kao ni sa regrutovanim bolesnicima sa PB, a koji su u trenutku pregleda i uzorkovanja krvi bili stariji od 50 godina. Bilo je 66 osoba ženskog i 77 osoba muškog pola, a na osnovu pregleda od strane neurologa, utvđeno je da su bez neuroloških smetnji.

Drugu kontrolnu grupu je činilo 348 ispitanika, mlađe životne dobi, koji u trenutku uzorkovanja krvi nisu imali neuroloških smetnji. U ovoj grupi je bilo 243 osoba ženskog i 105 osoba muškog pola.

Treća kontrolna grupa je obuhvatila srodnike bolesnika sa GB. U ovoj grupi je testirano 19 ispitanika, od toga 11 ženskog i 8 muškog pola.

Ispitanici su dali informisani pristanak za korišćenje njihovih uzoraka DNK za molekularno-genetičku analizu gena asociраниh sa PB. Uzorkovanje krvi, kao i dalje sprovedene procedure su identične kao i kod bolesnika sa PB, navedene u poglavlju 3.1.1.

## **3.2.       Metode**

U ovom istraživanju su analizirani odabrani egzoni gena *LRRK2*, *VPS35* i *GBA* metodom direktnog sekvenciranja u cilju detekcije tačkastih mutacija i malih duplikacija i delecija. Gen *Parkin* je analiziran u celosti navedenom metodom, kao i metodom multiple amplifikacije proba zavisne od ligacije (MLPA, eng. *multiplex ligation-dependent probe*

*amplification*) u cilju detekcije duplikacija i delecija čitavih egzona. Za detekciju rezultata reakcije sekvenciranja kao i MLPA reakcije primenjena je kapilarna elektroforeza.

U narednim poglavljima je detaljno opisana izolacija i kvantifikacija genomske DNK, kao i gorenavedene metode.

### **3.2.1. Izolacija genomske DNK**

Kao biološki materijal za sprovođenje molekularno-genetičkih analiza, u ovoj studiji je korišćena genomska DNK iz limfocita periferne krvi. Izolacija genomske DNK je vršena upotrebom jednog od dva navedena komercijalna kompleta: *QIAamp DNA mini kit* (proizvođač *QIAGEN*, Nemačka) ili *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit INVITROGEN* (proizvođač *Life Technologies*, USA). Prema specifikaciji proizvođača, ovi kompleti su namenjeni za brzu izolaciju ukupne DNK iz pune krvi, plazme, seruma, taloga leukocita, kosne srži, drugih telesnih tečnosti, kultivisanih ćelija, tkiva i forenzičkih uzoraka.

Pored toga, DNK upotrebljena u MLPA metodi je dobijena metodom isaljavanja (eng. „salting out“) (Miller i sar., 1988).

#### **3.2.1.1. Protokol za brzu izolaciju genomske DNK komercijalnim kitovima**

Procedura izolacije DNK iz limfocita periferne krvi upotrebom *QIAamp DNA mini kit-a* obuhvata nekoliko koraka i izvođena je prema uputstvu proizvođača, na sledeći način:

I korak – liziranje ćelija (limfocita) puferom za lizu (AL pufer) u prisustvu proteinaze K

- 20 µl proteinaze K se pipetom nanosi na dno mikrotube od 1,5 ml.
- Dodaje se 200 µl uzorka periferne krvi i 200 µl AL pufera i smeša se pulsno vorteksuje oko 15 sekundi.
- Inkubacija se vrši na 56°C u trajanju od 10 minuta, a zatim se kratko centrifugira.
- U smešu se dodaje 200 µl 96% etanola i pulsno se vorteksuje oko 15 s.

II korak – vezivanje molekula DNK za silikonsku membranu „*mini spin*“ kolonica

- Ukupna smeša od oko 620µl se pipetom prebacuje u *QIAamp mini spin* kolonicu.
- Kolonica se, sa postavljenom kolekcionom tubom, centrifugira 1 minut na 8000 rpm.
- Nakon centrifugiranja se odbaci kolekciona tuba sa tečnošću, dok se kolonica prebaci u čistu kolekcionu tubu.

III korak – ispiranje DNK radi odstranjivanja proteina i inhibitora PCR reakcija

- Dodaje se 500 µl pufera za ispiranje I i centrifugira se 1 minut na 8000 rpm.
- Odbaci se kolekciona tuba sa tečnošću i kolonica se prebaci u čistu kolekcionu tubu.
- Dodaje se 500 µl pufera za ispiranje II i centrifugira se 3 minuta na 13000 rpm.
- Odbaci se kolekciona tuba sa tečnošću i kolonica se prebaci u mikrotubu od 1,5 ml.

IV korak – eluiranje DNK

- Dodaje se 200 µl redestilovane vode u kolonicu i inkubira na sobnoj temperaturi u trajanju od 1 minuta.
- Centrifugira se 1 minut na 8000 rpm i odbaci se mini spin kolonica.
- Mikrotuba od 1,5 ml sa tečnošću (izolovana DNK, rastvorena u vodi) se čuva na +4 °C do određivanja koncentracije DNK, a zatim na -20°C na duži vremenski period.

Izolacija DNK primenom *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit-a* je, takođe izvođena prema uputstvu proizvođača i u protokolu uključuje neznatne razlike koje se u glavnom odnose na vreme trajanja i broj obrtaja centrifugiranja. Pored toga, u prvom koraku koji predstavlja liziranje ćelija u smešu se dodaje i 20 µl supstance RNase A, dok su količine drugih primenjenih hemikalija ne razlikuju.

Prema specifikaciji proizvođača, ukoliko se kao materijal koristi 200 µl pune krvi, očekuje se prinos od 6 µg DNK. Količina dobijene DNK, kao i njen kvalitet su merene primenom metode spektrofotometrije.



### **3.2.1.2. Protokol za izolaciju genomske DNK metodom isoljavanja**

U prvom koraku se uzorku (5-10ml) doda ista zapremina pufera za lizu (0,32 M saharoza; 10 mM TRIS HCl. pH 7,5; 1% TRITONx100; 5 mM MgCl<sub>2</sub>) i inkubira 15 minuta na 4 °C. Centrifugiranje od 15 minuta na 2000 rpm, odbacivanje supernatanta i resuspendovanje u fiziološkom puferu (0,075 M NaCl; 0,025 M EDTA pH 8) se ponavlja dok talog ne postane beo. Talog se resuspenduje u 3ml pufera (10 mM Tris-HCl. pH 7,5; 400 mM NaCl; 3 mM Na<sub>2</sub>EDTA). Inkubacija se vrši preko noći na 37°C sa 0,2 ml 10% SDS-a i 0,5ml proteinaze K.

Nakon digestije, dodaje se 1ml 6M NaCl, vorteksuje 15 sekundi i centrifugira 15 minuta na 3000 rpm. Preliveni supernatant se centrifugira 15 minuta na 4000 obrtaja. Supernatant se prelije u novu tubu i doda se ista količina izopropanola. Lagano se mućka do izdvajanja beličastog končića DNA koji se pipetom ili plastičnom špatulom prebacuje u 70 % etanol na 30 sekundi, osuši i resuspenduje u redestilovanoj vodi.

### **3.2.2. Određivanje koncentracije ukupne DNK**

Spektrofotometrija je metoda koja se zasniva na specifičnoj apsorpciji svetlosti ispitivane supstance u UV oblasti, odnosno merenju količine svetlosti koju neka supstanca apsorbuje na određenoj talasnoj dužini. Talasna dužina na kojoj nukleinske kiseline apsorbuju maksimum svetlosti je 260 nm, tako da količina apsorbovane svetlosti na toj talasnoj dužini odgovara koncentraciji DNK u ispitivanom uzorku.

Spektrofotometrijski se može utvrditi i čistoća samog uzorka DNK i na taj način proveriti uspešnost prečišćavanja tokom postupka izolacije. Na različitim talasnim dužinama UV spektra svetlost apsorbuju druge supstance koje se mogu naći u uzorku. Na talasnoj dužini od 230 nm, svetlost apsorbuju fenolni anjoni, tiocijanat i peptidi, na 280 nm najveća apsorpcija je od strane fenola i proteina, dok na prisustvo soli u uzorku ukazuje apsorbanca na 330 nm.

### **3.2.2.1. Protokol za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNK**

Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane DNK je vršeno na aparatu BioPhotometer (proizvođač *Eppendorf*, Nemačka) i obuhvatalo je sledeće korake:

- 5 µl uzorka DNK je razblaženo u redestilovanoj vodi u odnosu 1:10,
- Spektrofotometar je podešen za merenje dvolančane DNK koja je razblažena u navedenom odnosu,
- u plastičnu kivetu (proizvođač *Eppendorf*, Nemačka) je naneto 50 µl redestilovane vode,
- izmerena je apsorbance redestilovane vode, koja predstavlja rastvarač i podešena na aparatu kao „*blank*“,
- u plastičnu kivetu je naneto 50 µl razblaženja uzorka DNK,
- izmerena je apsorbance uzorka i prikazana je njegova koncentracija.

Nakon merenja apsorbance, osim koncentracije DNK, dobija se i podatak o odnosu apsorbanci na 260 nm i 280 nm, zatim na 230 nm i 260 nm, kao i apsorbance na 340 nm. Ukoliko je uzorak DNK dobrog kvaliteta prvi odnos  $A_{260}/A_{280}$  treba da bude između 1,8 i 2,0, dok drugi odnos  $A_{230}/A_{260}$  treba da bude manji od 0,5. Apsorbance izmerena na 340 nm ( $A_{340}$ ) treba da bude što bliža nuli.

### **3.2.3. Detekcija tačkastih mutacija i malih insercija i delecija**

Detekcija tačkastih mutacija, kao i malih insercija i delecija je vršena metodom direktnog sekvenciranja, koje se smatra „zlatnim standardom“ za ovakvu vrstu analiza. Ovom metodom se utvrđuje tačan redosled nukleotida u molekulu DNK i bazirana je na metodi terminacije sinteze lanca DNK koju su sedamdesetih godina prošlog veka osmislili Sanger i sardnici (Sanger i sar., 1977).

Postupci koji prethode direktnom sekvenciranju su amplifikacija DNK regiona od interesa, a zatim provera i prečišćavanje amplifikata.

### 3.2.3.1. Amplifikacija DNK regiona od interesa

Reakcija lančane polimerizacije (eng. *Polymerase Chain Reaction* – PCR) je metoda koja predstavlja *in vitro* amplifikaciju određene, unapred definisane sekvence DNK i koja se zasniva na procesu replikacije molekula DNK (Mullis i sar., 1986). Ono što definiše sekvencu koja se amplifikuje su sintetisane jednolančane oligonukleotidne sekvence (uzvodni i nizvodni prajmeri). Prajmeri su komplementarni krajevima DNK sekvence koja se amplifikuje i međusobno su suprotne orijentacije, tako da su krajevi umnoženog fragmenta definisani 5'- krajevima prajmera. Druga komponenta neophodna za uspešnu PCR reakciju je termostabina DNK polimeraza koja je izolovana iz Archaea *Thermus aquaticus* (*Taq* polimeraza). Osim DNK matrice, prajmera i polimeraze u PCR reakcionoj smeši su potrebne i sledeće komponente: nukleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), joni magnezijuma, pufer i aditivi. Nukleotidi predstavljaju gradivne elemente amplifikata, a joni magnezijuma grade komplekse sa nukleotidima i tako formiraju supstrat za *Taq* polimerazu. Pufer obezbeđuje optimalne uslove za rad polimeraze (pH od 8,3 do 9,2), dok aditivi pomažu u izvršenju kompletne denaturacije DNK, stabilizaciji polimeraze i eliminaciji sekundarnih struktura prajmera ili matrice.

PCR-om dolazi do eksponencijalne amplifikacije DNK tako što se reakcija sastoji od ponavljanja ciklusa koji obuhvataju denaturaciju DNK, hibridizaciju prajmera sa matricom (eng. „*aniling*“) i elongaciju tj. ekstenziju hibridizovanih prajmera katalizovanu polimerazom. Pre prvog ciklusa vrši se inicijalna temperaturna denaturacija DNK matrice, dok se nakon poslednjeg ciklusa izvodi finalna elongacija radi kompletiranja delimično sintetisanih produkata.

Detaljniji opisi pripreme i izvođenja PCR reakcija prikazani su narednim poglavljima.

#### **Sekvence oligonukleotidnih prajmera za PCR amplifikaciju**

Dizajniranje specifičnih oligonukleotidnih prajmera i njihovih temperatura hibridizacije je ključalno za postizanje uspešne PCR reakcije. Generalni principi koji su praćeni u procesu dizajniranja prajmera korišćenih u ovom istraživanju su da:

- dužina sekvence prajmera bude približno 20 bp (između 18bp i 24bp),
- temperature topljenja uzvodnog i nizvodnog prajmera budu približno jednake i, ukoliko je moguće, u opsegu između 50 i 60 C,
- zastupljenost GC baza bude između 40 i 60 %,
- 5' kraj jednog prajmera ne bude komplementaran 3' kraju drugog,
- ne sadrže palindromske sekvence koje bi na nižim temperaturama formirale strukture ukosnice, i
- početak prajmera je barem 30 nukleotida udaljen od egzon – intron granice.

Za dizajniranje prajmera korišćen je slobodno dostupan softver Primer3web verzija 4.0.0, <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> (Koressaar i Remm, 2007; Untergrasser i sar., 2012), a oligonukleotidne sekvence prajmera za amplifikaciju odabranih egzona *LRRK2* gena su prikazane u Tabeli 4, svih egzona *Parkin* gena u Tabeli 5, odabranih regiona *GBA* gena u Tabeli 6 i egzona 15 *VPS35* gena u Tabeli 7.

Tabela 4. Sekvence oligonukleotidnih prajmera za amplifikaciju egzona 24, 25, 29, 31, 35, 38, 40 i 41 *LRRK2* gena.

Egzon	Oznaka prajmera	Sekvence prajmera	Veličina produkta <sup>1</sup>
24	LRRK2-24F	5'-TCCTCAGATGGTTCACCTTTAG-3'	346
	LRRK2-24R	5'-ACATCAGCATATTTAGGCAAC-3'	
25	LRRK2-25F	5'-CCTCTTTGATGCTGTTCTTTG-3'	398
	LRRK2-25R	5'-GCCAACCTGCTAATTTTATTT-3'	
29	LRRK2-29F	5'-AAAAGAACTCACCTAAATCTCAAG-3'	351
	LRRK2-29R	5'-TCCAAACAAATGGTAAAAGTG-3'	
31	LRRK2-31F	5'-TCAACAGGAATGTGAGCAGG-3'	386
	LRRK2-31R	5'-CCCACAATTTTAAGTGAGTTGC-3'	
35	LRRK2-35F	5'-CATTTGCTCAACAAGGTTGG-3'	304
	LRRK2-35R	5'-ATGCCATCTCCCTAATTTCTC-3'	
28	LRRK2-38F	5'-GATTGGTTAGAAAGGGAGGG-3'	493
	LRRK2-38R	5'-CATCCTCATCTTGATCCTAGTCT-3'	
40	LRRK2-40F	5'-TTTAAAGAAGGAGATACGTGGGT-3'	519
	LRRK2-40R	5'-TACAGGGTTAAGATGATGGGTTTC-3'	
41	LRRK2-41F	5'-TGATGCTTGACATAGTGGACATT-3'	353
	LRRK2-41R	5'-CTGTTTTCCTTTTGACTCTTCTGA-3'	

<sup>1</sup> – broj baznih parova; F – nizvodni prajmer; R – uzvodni prajmer

Tabela 5. Sekvence oligonukleotidnih prajmera za amplifikaciju kodirajućih regiona *PARK2* gena.

Egzon	Oznaka prajmera	Sekvence prajmera	Veličina produkta <sup>1</sup>
1	PARK2-1F	5'-GCGCGGCTGGCGCCGCTGCGCGCA-3'	112
	PARK2-1R	5'-GCGGCGCAGAGAGGCTGTAC-3'	
2	PARK2-2F	5'-ATGTTGCTATCACCATTTAAGGG-3'	308
	PARK2-2R	5'-AGATTGGCAGCGCAGGCGGCATG-3'	
3	PARK2-3aF	5'-ACATGTCACTTTTGCTTCCCT-3'	480
	PARK2-3aR	5'-ACTGAGCTGCTGAGGTCCAC-3'	
3	PARK2-3bF	5'-AGAAACGCGGCGGGAGGCTG-3'	280
	PARK2-3bR	5'-AGGCCATGCTCCATGCAGACTGC-3'	
4	PARK2-4F	5'-ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTTGT-3'	261
	PARK2-4R	5'-AGGCAATGTGTTAGTACACA-3'	
5	PARK2-5F	5'-ACATGTCTTAAGGAGTACATTT-3'	227
	PARK2-5R	5'-TCTCTAATTTCTGGCAAACAGTG-3'	
6	PARK2-6F	5'-AGAGATTGTTTACTGTGGAAACA-3'	268
	PARK2-6R	5'-GAGTGATGCTATTTTATAGATCCT-3'	
7	PARK2-7F	5'-TGCCTTCCACACTGACAGGTACT-3'	239
	PARK2-7R	5'-TCTTTTGCATCCAAACATT-3'	
8	PARK2-8F	5'-TGATAGTCATAACTCTGTGTAAG-3'	206
	PARK2-8R	5'-ACTGTCTCATTAGCGTCTATCTT-3'	
9	PARK2-9F	5'-GGCTGAAATTTGCAGTCAGT-3'	278
	PARK2-9R	5'-AATATAATCCCAGCCCATGTGCA-3'	
10	PARK2-10F	5'-ATTGCCAAATGCAACCTAATGTC-3'	165
	PARK2-10R	5'-TTGGAGGAATGAGTAGGGCATT-3'	
11	PARK2-11F	5'-ACAGGGAACATAAACTCTGATCC-3'	303
	PARK2-11R	5'-CAACACACCAGGCACCTTCAGA-3'	
12	PARK2-12F	5'-GTTTGGGAATGCGTGT-3'	255
	PARK2-12R	5'-AGAATTAGAAAATGAAGGTAGACA-3'	

<sup>1</sup> – broj baznih parova; F – nizvodni prajmer; R – uzvodni prajmer

Tabela 6. Sekvence oligonukleotidnih prajmera za amplifikaciju egzona 7 i regiona od egzona 8 do egzona 11 *GBA* gena.

Egzon	Oznaka prajmera	Sekvence prajmera	Veličina produkta <sup>1</sup>
7	7F	5'-ACCCAGCTGGTCTGGTCCAC-3'	394
	7R	5'-ATCCATAGTTGGGTAGAGAATCGCT-3'	
8-11	8F	5'-TGTGTGCAAGGTCCAGGATCAG-3'	1682
	11R	5'-ACCACCTAGAGGGGAAAGTG-3'	

<sup>1</sup> – broj baznih parova; F – nizvodni prajmer; R – uzvodni prajmer

Tabela 7. Sekvence oligonukleotidnih prajmera za amplifikaciju egzona 15 *VPS35* gena koji sadrži opisanu mutaciju.

Egzon	Oznaka prajmera	Sekvence prajmera	Veličina produkta <sup>1</sup>
15	VPS35-15F	5'-TCACAGGATGGAGGTTTGGT-3'	398
	VPS35-15R	5'-AAGGCCATGACAACTGATCC-3'	

<sup>1</sup> – broj baznih parova; F – nizvodni prajmer; R – uzvodni prajmer

### Priprema PCR reakcije

Priprema PCR reakcija je vršena prema jednom od četiri protokola. Protokol po kome je vršena priprema PCR reakcije za amplifikaciju egzona od interesa *LRRK2* gena je označen kao Protokol I i koncentracija komponenti koje čine reakcionu smešu je navedena u Tabeli 8. Prema Protokolu II je pripremana PCR reakcija za amplifikaciju svih egzona *PARK2* gena, osim egzona 10 čija je amplifikacija pripremana prema Protokolu III (Tabela 9. i Tabela 10.). Protokol IV je korišćen za pripremu reakcione smeše za PCR amplifikaciju egzona 15 *VPS* gena, kao i egzona od interesa *GBA* gena. Sastav reakcione smeše ovog protokola je naveden u Tabeli 11.

Priprema reakcione smeše je vršena na ledu, u tankozidnim mikrotubama zapremine 0,2 ml ili u plejtovima sa 96 mesta namenjenim za izvođenje PCR reakcije. Sve komponente reakcione smeše su vorteksovane pre upotrebe, osim polimeraza.

Tabela 8. Sastav reakcione PCR smeše i finalna koncentracija sastojaka prema Protokolu I

Reagensi	Finalne koncentracije
10xPCR puferr	1x <i>Buffer with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>
25mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
10 mM dNTPs	0,2 mM svaki nukleotid
Uzvodni prajmer	0,4 pmol/μl
Nizvodni prajmer	0,4 pmol/μl
Taq polimeraza	0,5 U
DNK	30 ng
Dejonizovana voda	do 15 μl
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>15 μl</b>

Tabela 9. Sastav reakcione PCR smeše i finalna koncentracija sastojaka prema Protokolu II

<b>Reagensi</b>	<b>Finalne koncentracije</b>
10xPCR buffer	1x <i>Buffer with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>
25mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
10 mM dNTPs	0,2 mM svaki nukleotid
Uzvodni prajmer	0,4 pmol/μl
Nizvodni prajmer	0,4 pmol/μl
Betain	0,1 μl/ μl
Taq polimeraza	0,5 U
DNK	30 ng
Dejonizovana voda	do 15 μl
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>15 μl</b>

Tabela 10. Sastav reakcione PCR smeše i finalna koncentracija sastojaka prema Protokolu III.

<b>Reagensi</b>	<b>Finalne koncentracije</b>
10xPCR pufer	1x <i>Buffer with KCl<sup>1</sup></i>
25mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
10 mM dNTPs	0,2 mM svaki nukleotid
Uzvodni prajmer	0,4 pmol/μl
Nizvodni prajmer	0,4 pmol/μl
Betain	0,1 μl/ μl
Taq polimeraza	0,5 U
DNK	30 ng
Dejonizovana voda	do 15 μl
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>15 μl</b>

<sup>1</sup>10x pufer sa KCl – 100 mM Tris-HCl (pH 8,8 na 25°C), 500 mM KCl, 0,8% Nonidet P40 (proizvođač *Fermentas*, Nemačka).

Tabela 11. Sastav reakcione PCR smeše i finalna koncentracija sastojaka prema Protokolu IV.

Reagensi	Finalne koncentracije
10xPCR pufer	1x <i>Dream Taq Buffer</i> <sup>1</sup>
10 mM dNTPs	0,2 mM svaki nukleotid
Uzvodni prajmer	0,4 pmol/μl
Nizvodni prajmer	0,4 pmol/μl
Taq polimeraza	0,5 U <i>Dream Taq</i>
DNK	30 ng
Dejonizovana voda	do 15 μl
<b>Ukupna zapremina</b>	<b>15 μl</b>

<sup>1</sup>10x *Dream Taq* pufer -KCl, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM MgCl<sub>2</sub> (proizvođač *Fermentas*, Nemačka).

### Protokoli za izvođenje PCR amplifikacije

U toku ovog istraživanja primenjivano nekoliko različitih protokola za izvođenje PCR-a u cilju uspostavljanja procedura koje bi imale nabolji prinos amplifikacije, kao i najveću senzitivnost i specifičnost reakcije.

Prvi protokol koji je korišćen za amplifikaciju svih egzona *Parkin* gena je uključivao inicijalnu denaturaciju na 95 °C u trajanju od 5 minuta, zatim 30 ciklusa denaturacije na 95 °C, hibridizacije na 58 °C i elongacije na 72 °C (svaki u trajanju od 45 sekundi) i terminalnu elongaciju na 72 °C u trajanju od 10 minuta. Pojedinačni egzoni *Parkin* gena su zahtevali izmenu temperature hibridizacije što je dovelo do smanjenja efikasnosti u korišćenju aparata za izvođenje PCR-a (eng. *thermocycler*).

Za uspešnost PCR-a neophodno je uspostaviti optimalnu temperaturu hibridizacije koja zavisi od brojnih činilaca i zahteva optimizaciju u konkretnim laboratorijskim uslovima. Temperatura hibridizacije je u osnovi determinisana temperaturom topljenja prajmera (T<sub>m</sub>), ali je i pod uticajem drugih faktora kao što je sastav pufera koji se koristi u PCR reakcionoj smeši ili koncentracija samog prajmera ili uzorka (Roux, 1995). Suviše niske temperature hibridizacije mogu da dovedu do dimerizacije prajmera ili do



nespecifične amplifikacije, dok suviše visoke temperature mogu da smanje prinos reakcije zbog nemogućnosti vezivanja prajmera.

Upravo iz ovog razloga u laboratorijsku praksu je uveden *Touchdown* PCR program (TD PCR) i nakon optimizacije uslova svi protokoli u ovom istraživanju su zamenjeni ovim programom. TD PCR je omogućio znatno veću efikasnost u izvođenju PCR-a, kao i zadovoljavajući prinos i veoma visoku senzitivnost i specifičnost.

TD PCR je modifikacija PCR-a u kome je inicijalna temperatura hibridizacije viša od optimalne temperature topljenja prajmera ( $T_m$ ), a zatim se u narednim ciklusima izvođenja reakcije postepeno spušta do dostizanja optimalne temperature hibridizacije (Korbie i Mattick, 2008). Primena više temperature na početku ciklusa dovodi do akumulacije amplikona kod kojih je komplementarnost prajmera i matrice bila najveća i na taj način povećava specifičnost same reakcije. Snižavanje temperatura u narednim ciklusima sprečava potencijalno nizak prinos, ali je favorizovana amplifikacija željenog regiona.

U ovom istraživanju su primenjena 3 TD PCR protokola, prilagođena specifičnim zahtevima matrica i prajmera.

Protokol kojim je vršena amplifikacija egzona 40 *LRRK2* gena, zatim egzona 1, 2, 3 i 11 *PARK2* gena, egzona 15 *VPS35* gena, i egzona 7 *GBA* gena je označen kao 65td55 i izvođen je na sledeći način:

- Inicijalna denaturacija – 5 minuta na 94°C
- 10 ciklusa: denaturacija – 30 sekundi na 94°C  
aniling – 30 sekundi na 65°C  
elongacija – 45 sekundi na 72°C
- 20 ciklusa: denaturacija – 30 sekundi na 94°C  
aniling – 30 sekundi na 65°C, a zatim se snižava za 0,5°C u svakom narednom ciklusu do dostizanja 55°C  
elongacija – 45 sekundi na 72°C
- 10 ciklusa: denaturacija – 30 sekundi na 94°C  
aniling – 30 sekundi na 55°C  
elongacija – 45 sekundi na 72°C

- Finalna elongacija – 10 minuta na 72°C
- Hlađenje na 4°C do uzimanja uzoraka iz aparata.

Protokol kojim je vršena amplifikacija egzona 24, 25, 29, 31, 35, 38 i 41 *LRRK2* gena, i egzona 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 i 12 *PARK2* gena je označen kao 60td50 i izvođen je na sledeći način:

- Inicijalna denaturacija – 5 minuta na 94°C
- 10 ciklusa: denaturacija – 30 sekundi na 94°C  
aniling – 30 sekundi na 60°C  
elongacija – 45 sekundi na 72°C
- 20 ciklusa: denaturacija – 30 sekundi na 94°C  
aniling – 30 sekundi na 60°C, a zatim se snižava za 0,5°C u svakom narednom ciklusu do dostizanja 50°C  
elongacija – 45 sekundi na 72°C
- 10 ciklusa: denaturacija – 30 sekundi na 94°C  
aniling – 30 sekundi na 50°C  
elongacija – 45 sekundi na 72°C
- Finalna elongacija – 10 minuta na 72°C
- Hlađenje na 4°C do uzimanja uzoraka iz aparata.

Protokol kojim je vršena amplifikacija fragmenta koji obuhvata egzone 8, 9, 10 i 11 *GBA* gena je izvođen na sledeći način:

- Inicijalna denaturacija – 5 minuta na 94°C
- 20 ciklusa: denaturacija – 45 sekundi na 94°C  
aniling – 45 sekundi na 62°C, a zatim se snižava za 0,1°C u svakom narednom ciklusu do dostizanja 60°C  
elongacija – 3 minuta na 72°C
- 18 ciklusa: denaturacija – 45 sekundi na 94°C  
aniling – 45 sekundi na 60°C,  
elongacija – 3 minuta na 72°C

- Finalna elongacija – 7 minuta na 72°C
- Hlađenje na 4°C do uzimanja uzoraka iz aparata.

Aparati koji su korišćeni za PCR amplifikaciju su GeneAmp® PCR System 9700 ili Veriti (proizvođač *Life Sciences*, USA). Posle završetka PCR reakcije amplifikati su skladišteni na 4°C do dalje analize.

### 3.2.3.2. Provera PCR amplifikacije

U kojoj meri je amplifikacija željenih fragmenata bila uspešna i sa kolikim prinosom proveravano je primenom horizontalne elektroforeze na agaroznom gelu. Genralni princip na kome se zasniva ovo elektroforetsko razdvajanje je da naelektrisane čestice različite mase, pod uticajem električnog polja, prelaze različite putanje u agaroznom gelu, za isto vreme. Ovom metodom je vršeno razdvajanje fragmenata DNK na osnovu njihove dužine, a u opsegu od 80 do 200 bp. Dužina DNK fragmenta je određivana na osnovu komercijalnog markera koji se sastoji većege broja DNK fragmenata poznatih dužina, a koji se nanosi na agarozni gel kao jedan od uzoraka.

Za vizelizaciju uzoraka korišćen je, na početku istraživanja, etidijum – bromid. Ova supstanca ima sposobnost da interkalira u dvolančani molekul DNK i da zatim pod uticajem UV svetlosti intenzivno fluorescira emitujući vidljivu narandžastu boju i time omogućava uočavanje produkata PCR reakcije u obliku narandžastih traka na gelu.

Interkalirajuće svojstvo etidijum – bromida čini ga izuzetno jakim mutagenom, tako da je zbog svoje izrazite štetnosti po ljudsko zdravlje, tokom istraživanja zamnejen manje genotoksičnom supstancom, komercijalnog naziva SYBR® Safe (proizvođač *Life Technologies*, SAD). Ova supstanca predstavlja jednu od cijaninskih boja i omogućava isti kvalitet vizualizacije DNK kao i etidijum-bromid.

## Protokol za pripremu i izvođenje agarozne gel elektroforeze

Dve osnovne komponente agarozne elektroforeze su agarozni gel i pufer za elektroforezu. U ovom istraživanju su korišćeni 1xTBE pufer (45mM Tris-borat, 1mM EDTA, pH 8.0) i 2% agarozna.

Priprema i izvođenje elektroforeze su vršeni na sledeći način:

- 0,6 g agaroze je rastvoreno u 30ml 1xTBE pufera i zagrejano do ključanja,
- dodato je 3µl SYBR® Safe-a i smeša je ohlađena na približno 50 °C,
- dok je još uvek u tečnom stanju gel je izliven u kalup i postavljen je takozvani češalj kojim se u gelu prave udubljenja u koja se nalivaju uzorci,
- nakon hlađenja, češalj je uklonjen i gel je prebačen u kadicu za elektroforezu napunjenu 1xTBE puferom,
- prilikom nalivanja uzoraka na gel, 5 µl svakog uzorka je pomešano sa bojom (bromfenolplavo i glicerol) koja omogućava uspešnije nalivanje uzoraka na gel i praćenje elektroforeze,
- uključeno je strujno kolo i podešeni su parametri elektroforeze na 80V u trajanju od 15 minuta,
- vizuelizacija rezultata je vršena tako što je gel izložen UV svetlosti, a dokumentacija rezultata fotografisanjem osvetljenog gela u mraku.

Sistem koji je korišćen za elektroforezu je HE 33 Mini Submarine (proizvođač *GE Healthcare*, Švedska), dok je za vizelizaciju korišćen UV Transilluminator (proizvođač *HVD life sciences*, Austrija).

### 3.2.3.3. Prečišćavanje PCR produkta

Kao matrica za sekvenciranje se koriste produkti dobijeni PCR reakcijama opisanim u predhodnim poglavljima. Osim PCR produkta u rastvoru se nalaze i neugrađeni nukleotidi i prajmeri koji mogu nepovoljno da utiču na rezultate sekvenciranja. Kako bi se

ovo izbeglo, pre korišćenja PCR produkta za reakciju sekvenciranja potrebno ga je prečistiti i odstraniti neželjene nukleotide i prajmere.

U ovom istraživanju je primenjivano enzimsko prečišćavanje i korišćena su dva enzima: egzonukleaza, označena kao *Exonuclease I* (proizvođač *Fermentas*, Nemačka) i alkalna fosfataza, označena kao *Fast alkaline phosphatase* (proizvođač *Fermentas*, Nemačka). Egzonukleaza vrši degradaciju jednolančanih lanaca molekula DNK, tako da je njena uloga odstranjivanje neugrađenih prajmera, dok alkalna fosfataza oslobađa 5'- i 3'- fosfatne grupe sa neugrađenih nukleotida.

### **Protokol za prečišćavanje PCR produkata**

Reakcija prečišćavanja je pripremana na sledeći način:

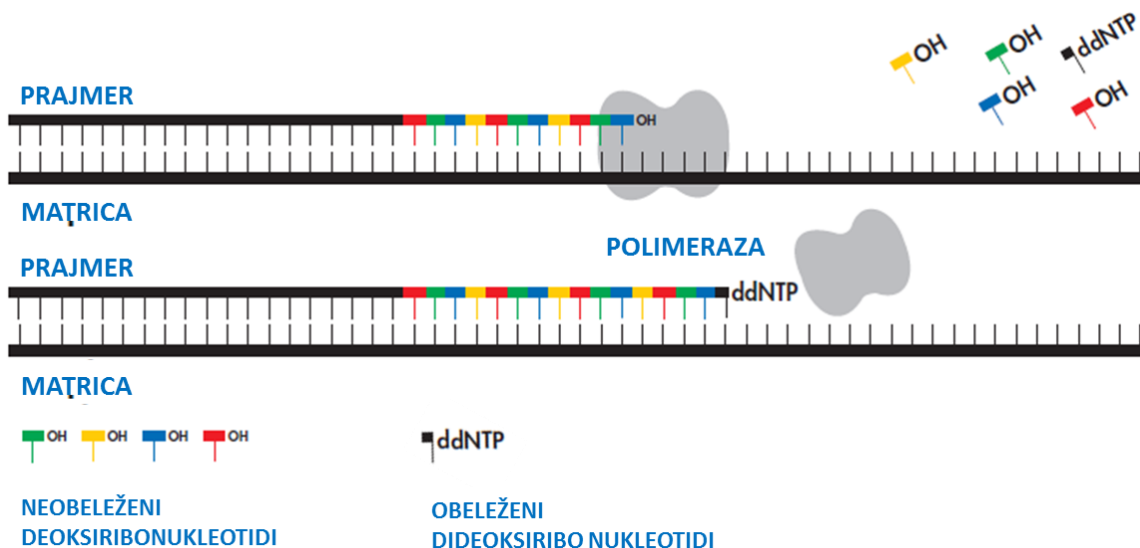
- napravljena je smeša enzima koja se sastojala od 20U (20U/μl) egzonukleaze i 2U (1U/μl) alkalne fosfataze, po uzorku,
- u 5 μl PCR produkta dodato 2 μl smeše enzima,
- Inkubacija je vršena na 37°C u trajanju od 15 minuta,
- Inaktivacija je vršena na 80°C u trajanju od 15 minuta.

Reakcija je pripremana na ledu, a inkubacija i inaktivacija su vršene u aparatima koji su korišćeni i za PCR amplifikaciju, GeneAmp® PCR System 9700 ili Veriti (proizvođač *Life Sciences*, USA). Ovako prečišćeni uzorci su skladišteni na 4°C do nedelju dana ili na -20°C duži vremenski period.

#### **3.2.3.4. Direktno sekvenciranje**

Metod direktnog sekvenciranja koji je primenjen u ovom istraživanju se naziva *Dye-terminator* sekvenciranje i u reakciji se koriste dideoksiribonukleozid trifosfati obeleženi različitim fluorescentnim bojama. Kao i kod klasičnog Sangerovog sekvenciranja, za izvođenje reakcije su potrebni matrica, DNK polimeraza, jedan prajmer, kao i smeša 2'- deoksiribonukleotid-trifosfata (dATP, dGTP, dCTP i dTTP). Pored toga, u Sangerovoj metodi u reakciju se dodaje i jedan od 2',3'- dideoksiribonukleotid-trifosfata

(ddATP, ddGTP, ddCTP ili ddTTP), dok se kod *Dye-terminator* sekvenciranja dodaje smeša ovih nukleotida koji su fluorescentno obeleženi različitim bojama. Na ovaj način je omogućeno da se sekvenciranje odvija u jednoj reakciji, a ne u četiri odvojene reakcije kako je rađeno u klasičnoj Sangerovoj metodi.



Slika 12. Šematski prikaz sekvenciranja po metodi terminacije sinteze DNK lanca (modifikovano prema internet prezentaciji URL: <http://www.qiagen.com>)

Tokom reakcije sekvenciranja vrši se sinteza novog lanca DNK sve dok se umesto 2'-deoksiribonukleotida ne ugradi 2',3'-dideoksiribonukleotid (Slika 12). Nakon ugradnje 2',3'-dideoksiribonukleotida, sinteza se prekida jer ovaj nukleotid nema 3'hidroksilnu grupu, tako da se ne može vezati sledeći nukleotid. Na taj način se dobija DNK fragment koji na svom 3' kraju ima fluorescentno obeleženi 2',3'-dideoksiribonukleotid. Ugradnja fluorescentno obeleženih 2',3'-dideoksiribonukleotida je stohastički proces, koji zavisi od koncentracije ovih gradivnih jedinica u reakcionoj smeši. Kao produkt reakcije sekvenciranja dobija se smeša ovih fragmenata različitih dužina.

### Priprema i izvođenje reakcije sekvenciranja

Kao što je već napomenuto, reakcija sekvenciranja koja je primenjena u ovom istraživanju je *Dye-terminator* sekvenciranje. PCR produkt čiju sekvencu želimo da

analiziramo je korišćen kao matrica, dok je kao prajmer upotrebljavan jedan od para prajmera koji su služili i za PCR reakciju, navedenih u Tabeli 5., 6. i 7. Jedino su u analizi sekvence egzona 8, 9, 10 i 11 *GBA* gena, primenjeni posebni prajmeri koji nisu korišćeni u PCR amplifikaciji, kako bi se izbegla amplifikacija *GBA* pseudogena. Ovi prajmeri su navedeni u Tabeli 12.

Tabela 12. Sekvence oligonukleotidnih prajmera korišćenih za sekvenciranje egzona 8, 9, 10 i 11 *GBA* gena.

Egzon	Oznaka prajmera	Sekvence prajmera
8	8R	5'-CTGGACAGGAAGGGCTTCT-3'
9	9R	5'-GCTCCCTCGTGGTGTAGAGT-3'
10	10R	5'-GAGGCACATCCTTAGAGGAG-3'
11	11F	5'-GTGGGCTGAAGACAGCGTTGG-3'

F – nizvodni prajmer; R – uzvodni prajmer

Ostale komponente potrebne za reakciju sekvenciranja su sadržane u optimalnim koncentracijama u komercijalnom kompletu pod nazivom *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (proizvođač *Life Technologies*, SAD).

Reakcija sekvenciranja je pripremana na sledeći način:

- Napravljena je smeša za sekvenciranje koja se sastojala od:
  - 2 µl 5X pufera za sekvenciranje (*BigDye® Terminator Sequencing Buffer*),
  - 0,5 µl *BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix-a*,
  - 0,2 µl prajmera,
  - redestilovane vode do ukupne zapremine reakcije od 10 µl.
- U reakciju je dodat prečišćeni PCR produkt čija količina u reakciju zavisi od veličine samog analiziranog produkta. Za produkte dužine od 100 do 200 bp dodato je 1–3 ng, za produkte veličine od 200 do 500 bp 3–10 ng, za produkte veličine od 500 do 1000 bp 5–20 ng, i za produkte od 1000 do 2000 bp 10–40 ng.
- Program po kome je vršena reakcija sekvenciranja se sastojao od inicijalne denaturacije na 96°C u trajanju od 3 minuta, zatim 25 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije na 96°C u trajanju od 20 sekundi, hibridizacije na 50°C u trajanju od 5 sekundi i elongacije na 60°C u trajanju od 4 minuta.

Reakcija je pripremana na ledu, a vršena u aparatima koji su korišćeni i za PCR amplifikaciju i prečišćavanje PCR produkta, GeneAmp® PCR System 9700 ili Veriti (proizvođač *Life Sciences*, USA). Produkti reakcije sekvenciranja su skladišteni na 4°C u mraku.

### **Prečišćavanje produkata reakcije sekvenciranja**

Prečišćavanje produkta sekvenciranja se sprovodi kako bi se odstranili neugrađeni gradivni elementi, kao i ostale komponente reakcione smeše sekvenciranja. Pre svega je neophodno ukloniti fluorescentne 2',3'-dideoksiribonukleotide kako ne bi remetili očitavanje fluorescentno obeleženih fragmenata DNK koji se analiziraju.

Tokom istraživanja je vršena optimizacija nekoliko različitih protokola za prečišćavanje (npr. BigDye® X Terminator™ Purification Kit), ali se kao najefikasniji pokazao protokol prečišćavanja etanolom precipitacijom sa natrijum-acetatom. Do precipitacije DNK dolazi usled formiranja jonskih veza između jona natrijuma i fosfatnih grupa u DNK molekulu, što je omogućeno prisustvom dovoljne količine etanola u vodenom rastvoru. Na ovaj način se formira talog u kome su fragmenti DNK i supernatant sa kojim se odstranjuju neugrađeni nukleotidi.

Prečišćavanje je vršeno prema Protokolu I ukoliko je sekvenciranje pripremano u tankozidnim tubicama zapremine 0,2 µl, ili prema Protokolu II u slučaju kada je sekvenciranje pripremano u plejtovima za sekvenciranje 96 uzoraka.

Nakon precipitacije talog je rastvoren u formamidu koji denaturiše DNK fragmente i održava ih u linearnom jednolančanom obliku kako bi mogli biti analizirani metodom kapilarne elektrogoreze na automatskom sekvencatoru.

#### **Protokol I za prečišćavanje reakcije sekvenciranja**

- U ukupnu količinu reakcije sekvenciranja (10 µl) dodato je 10 µl redestilovane vode, 2 µl 3M Na-acetata i 50 µl 99% etanola, navedenim redosledom,
- Inkubacija je vršena na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta, u mraku,
- Uzorak je centrifugiran na 13000rpm u trajanju od 15 minuta,



- Pažljivo je odvađen supernatant pipetiranjem,
- Naliveno je 70 µl 70% etanola,
- Uzorak je centrifugiran na 13000rpm u trajanju od 10 minuta,
- Pažljivo je odvađen supernatant pipetiranjem,
- Talog je sušen na 90°C u trajanju od 2 minuta (otvorene tubice u *thermocycler*-u sa otvorenim poklopcem),
- Naliveno je 20 µl formamida i vorteksovano oko 10 sekundi,
- Denaturacija je vršena na 95°C u trajanju od 2 minuta.
- Uzorci su skladišteni na -20 °C u mraku.

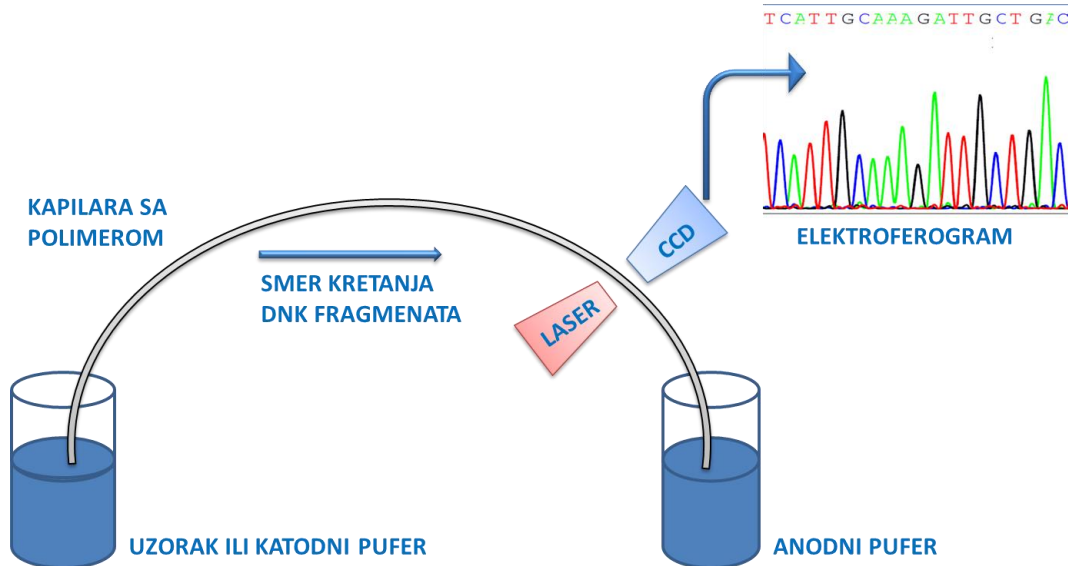
#### Protokol II za prečišćavanje reakcije sekvenciranja

- Napravljena je smeša koja se sastoji od 50 µl 99% etanola, 10 µl redestilovane vode i 2 µl 3M Na-acetata, po uzorku,
- U svaki uzorak u plejetu je naliveno po 60 µl gorenavedene smeše,
- Plejt je zalepljan adhezivnom folijom i inkubacija je vršena na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta, u mraku,
- Plejt sa uzorcima je centrifugiran na 3700rpm u trajanju od 45 minuta, na temperaturi od 30 °C,
- Nakon centrifugiranja odlepljena je adhezivna folija i supernatant je odstranjen otresanjem plejta i lupkanjem izvrnutog plejta na papirnoj vati,
- Plejt je centrifugiran kratko do 500rpm, okrenut naopako na komadu papirne vate, kako bi se odstranile preostale kapljice supernatanta,
- Naliveno je 50 µl 70% etanola i zalepljena ista adhezivna folija,
- Plejt sa uzorcima je centrifugiran na 3700rpm u trajanju od 30 minuta,
- Nakon centrifugiranja odlepljena je adhezivna folija i supernatant je odstranjen otresanjem plejta i lupkanjem izvrnutog plejta na papirnoj vati,
- Plejt je centrifugiran kratko do 500rpm, okrenut naopako na komadu papirne vate, kako bi se odstranile preostale kapljice supernatanta,

- Naliveno je 12  $\mu$ l formamida (eng. *HiDi Formamide*, proizvođač *Life Technologies* – *Applied Biosystems*, SAD) i skladišteno na 4 °C u mraku, preko noći, a zatim ili postavljano na automatski sekvenator ili skladišteno na -20 °C u mraku.

### 3.2.3.5. Kapilarna elektroforeza

Razdvajanje fragmenata dobijenih direktnim sekvenciranjem vrši se kapilarnom elektroforezom koja predstavlja visokosenzitivnu metodu, zasnovanu na principu tradicionalnih gel elektroforetskih metoda, ali u tankoj staklenoj kapilari ispunjenoj polimerom (Slika 13.). Ovo je metoda visoke rezolucije koja omogućava razdvajenje i fragmenata čija je razlika u dužini svega jedan bazni par. Vizuelizacija se vrši pomoću ekscitacije fluorescentnih boja na 3' kraju DNK fragmenta i detekcijom emitovane svetlosti koja je karakteristične talasne dužine za svaku boju. Detekcija se vrši pomoću CCD kamere i podaci se automatski softverski obrađuju kako bi se dobio podatak o ugrađenom nukleotidu.



Slika 13. Šematski prikaz osnovnog principa automatizovane kapilarne elektroforeze

Detekcija i primarna obrada rezultata su sprovedene na automatskom sekvenatoru ABI3500 (proizvođač *Life Technologies*, SAD). Ovaj aparat predstavlja sistem za

elektroforezu koja se obavlja potpuno automatski od uzimanja uzoraka do primarne analize rezultata i može se primenjivati za analizu sekvenciranja kao i fragmentnu analizu. Opremljen je sa osam kapilara koje su ispunjene polimerom POP7 (proizvođač *Life Technologies*, SAD), što omogućava istovremenu analizu 8 uzoraka.

Softver koji se koristi za setovanje i kontrolu procesa elektroforeze se zove 3500 Data Collection verzija 1.0 (proizvođač *Life Technologies – Applied Biosystems*, SAD). Uslovi pod kojima je sprovedena elektroforeza su sledeći:

- injekciono vreme – 8 sekundi,
- injekciona voltaža – 1,6 kV,
- voltaža elektroforeze – 19,5 kV,
- trajanje elektroforeze – 1400 sekundi.

Kapilara koja je korišćena je bila dužine 50 cm, a polimer POP-7, na temperaturi od 60°C. Za podešavanje uslova elektroforeze, upravljanje i kontrolu procesa, kao i prikupljanje neobrađenih podataka korišćen je softver 3500 Data Collection verzija 1.0.

Rezultat koji se dobija nakon primarne obrade podataka na automatskom sekvenatoru je predstavljen elektroferogramom koji čini niz obojenih pikova gde svaki pik predstavlja poziciju jednog nukleotida. Ovako dobijen rezultat se može analizirati velikom broju softvera namenjenih sekundarnoj analizi DNK sekvenci.

#### **3.2.3.6. Analiza sekvenci**

Automatski sekvenator ABI350 je opremljen softverom za analizu DNK sekvenci pod nazivom Sequencing Analysis verzija 5.4. (proizvođač *Life Technologies – Applied Biosystems*, SAD). Ovaj softver je korišćen samo za vizuelnu proveru stepena uspešnosti elektroforeze. Za detaljniju analizu korišćen je softver Sequencher 4.10.1 Demo (proizvođač *Gene Codes Corporation*, SAD). Ovaj softver ima mogućnost poređenja velikog broja sekvenci i njihovo grupisanje u klastere ukoliko ispunjavaju zadate nivoe podudarnosti. Takođe, moguće je učitati u formi tekstualnog fajla referentnu sekvencu sa kojom bi se vršilo poređenje sekvenci dobijenih kapilarnom elektroforezom. Referentne sekvence za svaki analizirani egzon su preuzimane sa Ensemble baze podataka

(<http://www.ensembl.org/index.html>). Softver je ukazivao na svako postojanje neslaganja u redosledu nukleotida između referentne i analizirane sekvence, ali je u analizi svake sekvence primenjivana i subjektivna, vizuelna metoda.

Sve detektovene promene su pretraživane u nekoliko baza podataka kako bi se utvrdilo da li su već opisane u literaturi i kakav je njihov uticaj na nastanak bolesti. Dve baze u kojima je prvo vršena pretraga su HGMD (eng. *The Human Gene Mutation Database*, URL: <http://www.hgmd.org>) i PDMutDB (eng. *Parkinsons disease mutation database*, URL: <http://www.molgen.vib-ua.be/PDMutDB/>) (Nuytemans i sar., 2010; Cruts i sar., 2012). Ukoliko u ovim bazama mutacije nisu navedene, pretrživane su baze formirane na osnovu analize velikog broja genoma ili egzoma. Tri baze u kojima je vršena pretraga su: 1000 Genomes (URL: <http://browser.1000genomes.org/index.html>) (1000 Genomes Project Consortium, 2012), dbSNP142 (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) (Sherry i sar., 2001) i najnovija baza ExAC (eng. *Exome Aggregation Consortium*, URL: <http://exac.broadinstitute.org>).

### 3.2.3.7. *In silico* analiza

. Ukoliko detektovana promena jednog nukleotida nije opisana do sada u literaturi, njena potencijalna patogenost je ispitivana *in silico*, primenom nekoliko softvera koji ispituju efekat mutacija na proteinskom nivou. Svi primenjeni softveri su slobodno dostupni na internetu, na dole navedenim adresama.

Za promene u kodirajućim sekvencama su korišćeni:

- MutationTaster – URL: <http://www.mutationtaster.org/> (Schwarz i sar., 2010),
- PolyPhen-2 – URL: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (Adzhubei i sar., 2010),
- SIFT (eng. *Sorting Intolerant From Tolerant*) – URL: <http://sift.jcvi.org> (Ng i Henikoff, 2001),
- MutPred – URL: <http://mutdb.org/mutpred> (Li i sar., 2009),

- PROVEAN (eng. *Protein Variation Effect Analyzer*) – URL: <http://provean.jcvi.org> (Choi i sar., 2012) i
- SNPs&GO – URL: <http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/> (Calabrese i sar., 2009).

Za promene koje mogu uticati na promenu mesta za iskrajanje egzona primenjeni su:

- NNSplice – URL: [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (Reese i sar., 1997) i
- NetGene2 – URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/> (Hebsgaard i sar., 1996).

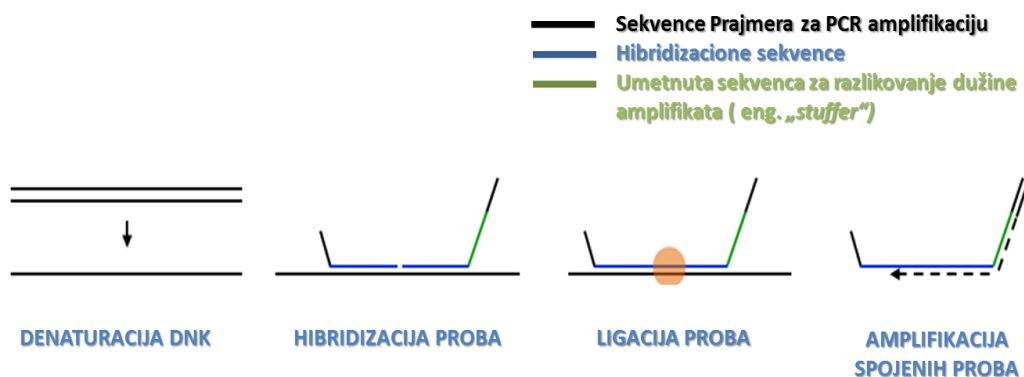
Navedeni programi koriste nekoliko različitih pristupa u utvrđivanju patogenosti mutacija. Na primer, program SIFT polazi od toga da su sva bitna mesta u proteinu evoluciono konzervirana i vrši poređenje pozicije koja je pogođena u velikom broju vrsta, dok program MutPred modeluje strukturu proteina i poredi razlike u funkcionalnim mestima u neizmenjenom i izmenjenom proteinu. Ni jedan navedeni program se ne može samtrati potpuno pouzdanim i, imajući u vidu različite metode koje koriste, primenom većeg broja softvera dobijaju se pouzdaniji podaci o prirodi mutacije.

### **3.2.4. Detekcija velikih duplikacija i delecija**

Detekcija delecija i duplikacija čitavih egzona u nekoliko gena koji su asocirani sa nastankom PB je vršena primenom metode multiple amplifikacije proba zavisne od ligacije (MLPA, eng. *multiplex ligation-dependent probe amplification*) koja je osmišljena kao metoda za detekciju kvantitativnih promena u genomu (Schouten i sar., 2002). Ovo je polu-kvantitativna metoda koja se koristi u determinaciji relativnog broja kopija čak i do 60 različitih DNK sekvenci u samo jednoj reakciji baziranoj na multipleks PCR-u.

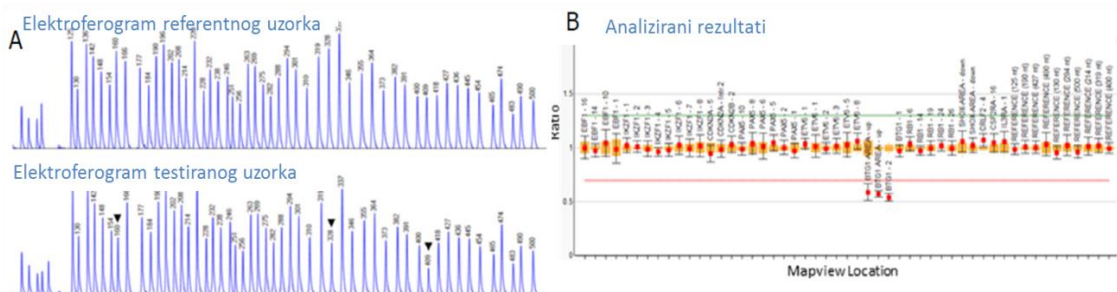
Princip MLPA analize se zasniva na upotrebi specifičnih proba koje hibridizuju sa odgovarajućim regionima DNK i PCR amplifikaciji u kojoj se koristi samo jedan par prajmera. Prajmeri su tako dizajnirani da omogućavaju amplifikaciju do 60 različitih proba.

Prvi korak u reakciji je denaturacija uzorka DNK koji se analizira (matrice). Uzorku se zatim dodaje smeša definisanih proba i vrši se njihova hibridizacija sa matricom. Svaka proba se sastoji od dva odvojena oligonukleotida, dugog i kratkog, koji hibridizuju neposredno jedan do drugog. Ukoliko su oba oligonukleotida hibridizovala, u sledećem koraku će se izvršiti se njihova ligacija i formirat će se kompletna proba. Tokom PCR reakcije dolazi do amplifikacije samo kompletnih proba (Slika 14.). Probe su dizajnirane tako jedan oligonukleotid sadrži i univerzalnu sekvencu koju prepoznaje uzvodni prajmer, a drugi sadrži univerzalnu sekvencu koju prepoznaje nizvodni prajmer što omogućava istovremenu PCR amplifikaciju. Pored toga, jedan od para oligonukleotida ima umetnutu sekvencu čija se dužina razlikuje između proba za različite regione što omogućava razdvajanje proba prema dužini.



Slika 14. Šematski prikaz MLPA reakcije. Modifikovano prema uputstvu proizvođača *MRC-Holland* za primenu MLPA kita (URL: <http://www.mlpa.com>)

Jedan od prajmera za PCR je fluorescentno obeležen što omogućava vizuelizaciju svake amplifikovane probe pri razdvajanju fragmenata po dužini. Fragmentna analiza se vrši primenom kapilarne elektroforeze i kao rezultat se dobija elektroferogram (Slika 15.A). Nakon softverske analize rezultata primenom softvera Coffalizer.Net izračunava se relativni odnos proba u testiranom uzorku i prikazuje na grafikonu, poredano prema hromozomskoj lokaciji (Slika 15.B).



Slika 15. Primer rezultata MLPA analize. A – Elektroferogrami dobijeni nakon kapilarne elektroforeze produkata MLPA reakcije. Gore- referentni uzorak. Dole-testirani uzorak sa strelicama naglašenim promenama. B – Prikaz rezultata nakon obrade u programu Coffalizer.Net Coffalizer. Modifikovano prema uputstvu proizvođača *MRC-Holland* za primenu MLPA kita (URL: <http://www.mlpa.com>).

Za detekciju duplikacija i delecija čitavih egzona korišćeni su komercijalni kitovi SALSA MLPA P051 – C3 i P052 – C2 (proizvođač *MRC-Holland*, Holandija).

### 3.2.4.1. Komponente SALSA MLPA kitova

Kitovi SALSA MLPA P051 – C3 i P052 – C2 su dizajnirani da pruže informaciju o aberantnom broju kopija u nekim od gena asociiranim sa PB, kao što su: *SNCA*, *Parkin*, *UCHL1*, *PINK1*, *DJ-1*, *LRRK2*, *GCH1* i *ATP13A2*. Jedino za gen *Parkin* postoje probe za sve egzone u oba ova kita, pri čemu se probe u kitovima međusobno razlikuju.

U okviru P051 – C3 kita se nalaze probe za sledeće egzone: svih 6 egzona *SNCA* gena, svih 12 egzona *Parkin* gena, svih 8 egzona *PINK1* gena, svih 7 egzona *DJ-1* gena, kao i 2 egzona *ATP13A2* gena. Pored toga, kit obuhvata i probu za *TNFRSF9* gen koji je lociran 23 kb p-telomerno od *DJ-1* gena i probe za *CAV1* i *CAV2* gene. Sem probe koje ukazuju na aberantni broj kopija nekog od navedenih egzona, ovaj kit sadrži i dve probe koje se služe za detekciju tačkastih mutacija. Ove probe se amplifikuju samo u slučaju prisustva mutacije G2019S u *LRRK2* genu i u prisustvu mutacije A30P u *SNCA* genu. P051 – C3 kit sadrži i 8 referentnih proba koje detektuju različite pozicije na autozomnim hromozomima.

U okviru P052 – C2 kita se nalaze probe za sledeće egzone: svih 12 egzona *Parkin* gena, 4 egzona *UCHL1* gena, 7 egzona *LRRK2*, 5 egzona *GCH1* gena, 2 egzona *ATP13A2* gena, jednog egzona *SNCA* gena. Ovaj kit sadrži i jednu probu za detekciju tačkaste mutacije G2019S u *LRRK2* genu, kao i 9 referentnih proba koje detektuju različite pozicije na autozomnim hromozomima.

### 3.2.4.2. Protokol za izvođenje MLPA reakcije

MLPA reakcija je pripremana i izvođena prema uputstvima i preporučenom protokolu od strane proizvođača MRC-Holland-a. Protokol koji je korišćen je namenjen izvođenju svih reakcija u jednoj tubi (eng. *one-tube-protocol*), dok se sama procedura i programa u PCR aparatima izvodi u dva dana. Prvog dana se vrši denaturacija DNK i hibridizacija proba koja traje tokom noći, da bi se drugog dana izvodila ligacija proba i njihova PCR amplifikacija.

Procedura MLPA reakcije je izvođena na sledeći način:

I dan

- 5 µl uzorka DNK rastovrenog u redestilovanoj vodi, koji sadrži između 50 i 250 ng DNK (optimalno je podešavano na približno 100 ng) je denaturisano na 98°C u trajanju od 5 minuta,
- Tokom denaturacije uzorka pripremana je hibridizaciona smeša koju čine:
  - 1,5 µl MLPA pufera (KCl, Tris-HCl, EDTA i PEG-6000. pH 8.5), i
  - 1,5 µl smeše proba (sintetički ologonukleotidi ili oligonukleotidi prečišćeni iz bakterija, Tris-HCl, EDTA. pH 8.0)

Svaki sastojak smeše je odleđen i promešan vorteksovanjem, kao i napravljena smeša,

- Uzorci su ohlađeni na temperaturu od 25°C i u svaki uzorak je naliveno po 3 µl hibridizacione smeše,
- Uzorci su inkubirani na 95°C u trajanju jednog minuta, a zatim na 60°C u trajanju od 16 do 20 sati (preko noći).



## II dan

- Pripremljena je ligaciona smeša koju čine:
  - 25 µl redestilovane vode,
  - 3 µl ligacionog pufera A (NAD bakterijskog porekla, pH 3.5),
  - 3 µl ligacionog pufera B (Tris-HCl, nejonski deterdžent, MgCl<sub>2</sub>. pH 8.5),
  - 1 µl smeše Ligase-65 (Glycerol, BRIJ (0.05 %), EDTA, Beta-Mercaptoethanol (0.1%), KCl, Tris-HCl. pH 7.5, Ligase-65 enzim bakterijskog porekla),
- Temperatura uzoraka je sa 60°C spuštena na 54°C, u PCR aparatu, i u svaki uzorak je naliveno po 32 µl ligacione smeše i promešano pipetiranjem,
- Uzorci su inkubirani na 54°C u tajanju od 15 minuta, a zatim je reakcija inaktivirana na 98°C u tarajnju od 5 minuta i uzorci su ohlađeni na 20°C,
- Tokom ligacije uzoraka pripremljena je smeša za PCR reakciju koju čine:
  - 7,5 µl redestilovane vode,
  - 2 µl SALSA PCR smeše prajmera (sintetički oligonukleotidi od kojih je jedan fluorescentno obeležen FAM), dNTPs, Tris (HCl, KCl, EDTA, BRIJ (0.04 %), pH 8.0),
  - 0,5 µl SALSA polimeraze (Glicerol, BRIJ (0.5 %), EDTA, DTT (0.1 %), KCl, Tris-HCl, polimeraza enzim bakterijskog porekla, pH 7.5).
- Na sobnoj temperaturi je u svaki uzorak naliveno po 10 µl PCR smeše i promešano pipetiranjem,
- PCR reakcija se sastojala od 35 ciklusa koji su obuhvatali denaturaciju na 95°C u trajanju od 30 sekundi, hibridizaciju na 60°C u trajanju od 30 sekundi i elongaciju na 72°C u trajanju od jednog minuta. Nakon toga je vršena finalna elongacija na 72°C, u trajanju od 20 minuta i uzorci su ohlađeni na 15°C.

Produkti PCR reakcije su čuvani na 4°C u mraku do 7 dana ili na -20°C duži vremenski period, takođe zaštićeni od svetla.

Reakcija MLPA je vršena u aparatima koji su korišćeni i za PCR amplifikaciju i prečišćavanje PCR produkta, GeneAmp® PCR System 9700 ili Veriti (proizvođač *Life Sciences*, SAD) prema sledećem programu:

Denaturacija	98°C	5 minuta
	25°C	neograničeno
Hibridizacija	95°C	1 minut
	60°C	neograničeno
Ligacija	54°C	neograničeno
	54°C	15 minuta
	98°C	5 minuta
	20°C	neograničeno
PCR reakcija	35 ciklusa: 95°C 30 sekundi	
		60°C 30 sekundi
		72°C 60 sekundi
	72°C	20 minuta
	15°C	neograničeno

#### 3.2.4.3. Kapilarna elektroforeza

Nakon završene MLPA reakcije, uzorci su pripremani za kapilarnu elektroforzu. U okviru ove pripreme sa uzorkom se meša standard za veličinu na osnovu kog se određuju dužine analiziranih fragmenata.

Smeša koja je analizirana kapilarnom elektroforzom se sastojala od sledećih komponenti: 0,7 µl produkta MLPA reakcije,

0,3 µl standarda za veličinu (GeneScan™-500 LIZ, proizvođač *Life Technologies* – *Applied Biosystems*, SAD)

9 µl formamida (eng. *HiDi Formamide*, proizvođač *Life Technologies* – *Applied Biosystems*, SAD).

Ovako pripremljeni uzorci su denaturisani na 80°C u trajanju od 2 minuta, a zatim ohlađeni na 4°C.

Razdvajanje uzoraka kapilarnom elektroforezom je vršeno na aparatu ABI 3500 Genetic Analyzer (proizvođač *Life Technologies – Applied Biosystems*, SAD). Uslovi elektroforeze su bili sledeći:

- injeksiono vreme – 15 sekundi,
- injeksiona voltaža – 1,6 kV,
- voltaža elektroforeze – 10 kV,
- trajanje elektroforeze – 3000 sekundi

Kapilara koja je korišćena je bila dužine 50 cm, a polimer POP-7, na temperaturi od 60°C. Za podešavanje uslova elektroforeze, upravljanje i kontrolu procesa, kao i prikupljanje neobrađenih podataka korišćen je softver 3500 Data Collection verzija 1.0 (proizvođač *Life Technologies – Applied Biosystems*, SAD).

#### **3.2.4.4. Analiza rezultata**

Rezultati dobijeni kapilarnom elektroforezom su primarno obrađeni upotrebom softvera Gene Mapper verzija 4.1. (proizvođač *Life Technologies – Applied Biosystems*, SAD). Dalja analiza, kao i interpretacija rezultata je vršena primenom softvera Coffalyser.Net verzija 9 (proizvođač *MRC-Holland*, Holandija).

Radi dobijanja pouzdanih rezultata pri svakoj MLPA analizi je korišćeno najmanje tri kontrolna uzorka. Kao kontrolni uzorci su upotrebljene DNK neurološki zdravih osoba starijih od 50 godina. Realtivna visina pika (RPH eng. *relative peak heights*) svake probe u uzorku je poređena sa relativnom visinom pika referentnih uzoraka, pokazujući relativni broj kopija analizirane sekvence u DNK uzorku. RPH za svaku probu je dobijena tako što je visina pika te probe normalizovana prema kombinovanim visinama kontrolnih proba u uzorku. Delecija jedne ili više analiziranih sekvenci u uzorku dovodi do smanjenja visine pika, dok multiplikacije analiziranih sekvenci dovode do povećanja visine pika. Ukoliko je prisutna normalna doza analizirane sekvence, ovaj odnos treba da bude približno 1,0 (u rasponu od 0,8 do 1,2). Ukoliko je odnos oko 0,5 u analiziranoj sekvenci imamo

heterozigotnu deleciju, dok vrednost oko 1,5 heterozigotnu duplikaciju. Vrednost nula se odnosi na potpuno odsustvo analiziranaog regiona.

### **3.2.5. Statistička analiza**

U analizi podataka korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike. U okviru deskriptivnih metoda podaci su prikazivani kao distribucije frekvencija, proporcije i srednje vrednosti sa standardnom devijacijom.

Kontinuirane varijable poređene su analizom varijanse, uz Bonferoni post-hok test ukoliko su istovremeno poređene srednje vrednosti u više kategorija. Kategorijske varijable su, u zavisnosti od broja ispitanika, poređene Fišerovim testom egzaktne verovatnoće i Hi kvadrat testom.

Udruženost demografskih i kliničkih karakteristika sa prisustvom mutacija ispitivana je logističkom regresionom analizom, a kao mera efekta korišćen je OR (eng. *odds ratio*) uz 95% intervale poverenja (CI). U slučaju poređenja kontinuiranih varijabli u smislu pacijenata sa složenim heterozigotnim ili heterozigotnim mutacijama i pacijenata bez mutacija korišćen je generalni linearni model, pri čemu je zavisna varijabla bila prisustvo mutacije a fiksni faktor klinička odnosno demografska varijabla.

Kompletna statistička analiza rađena je u statističkom paketu SPSS v17.0.

## **4. *Rezultati***

## 4. REZULTATI

### 4.1. Analiza autozomno-dominantne Parkinsonove bolesti: *PARK8/LRRK2*

#### 4.1.1. Demografska i klinička karakterizacija ispitanika

Kod ukupno 496 bolesnika vršena je analiza odabranih egzona 31, 35 i 41, kao i egzon/intron granica *LRRK2* gena, metodom direktnog sekvenciranja. U analizu su uključeni svi dostupni bolesnici sa kliničkom dijagnozom PB, bez obzira na godine početka bolesti i porodičnu anamnezu.

Ispitivanih bolesnika muškog pola je bilo 305 (61,5%), dok je ženski pol bio zastupljen sa 191 bolesnikom (38,5%), tako da je približno 1,6 puta bilo više bolesnika muškog pola. Podaci o godinama nastanka prvih simptoma bolesti su bili dostupni za 488 bolesnika. Prosečne godine početka bolesti su bile 52,8 ( $\pm 11,1$ ), i varirale su i opsegu od 17 do 79 godina. Podaci o porodičnoj anamnezi su dobijani autoanamnestički i prikupljeni su od 438 bolesnika. Čak 90 bolesnika je prijavilo prisustvo simptoma PB kod nekog od svojih srodnika.

Klinička prezentacija bolesti je bila takva da je kod 236 (52,4%) bolesnika prva zahvaćena strana tela bila leva, kod 186 (41,3%) desna, dok je kod 28 (6,2%) bolesnika pojava prvih simptoma bila obostrana. Kod 46 bolesnika nije bio dostupan podatak o distribuciji prvih simptoma. Najveći broj bolesnika je navodio prvo zahvaćenost gornjih ekstremiteta (74,5%; 331/444), zatim istovremenu zahvaćenost i gornjih i donjih ekstremiteta (63/444 bolesnika; 14,2%), i najmanje samo donjih ekstremiteta (50/444; 11,3%). Podaci o zastupljenosti početnih simptoma bolesti su prikazani u Tabeli 13.

Tabela 13. Zastupljenost i distribucija početnih simptoma kod bolesnika testiranih na prisustvo mutacija u *LRRK2* i *VPS35* genu.

Jedan inicijalni simptom	Broj bolesnika	Dva ili više inicijalnih simptoma	Broj bolesnika
tremor	209	rigiditet i bradikinezija	2
bradikinezija	123	rigiditet i tremor	3
rigiditet	64	bradikinezija i tremor	2
bol	19	bradikinezija i bol	1
problemi u pisanju	6	tremor i problemi sa hodom	1
problemi sa hodom	14	rigiditet,bradikinezija i tremor	1

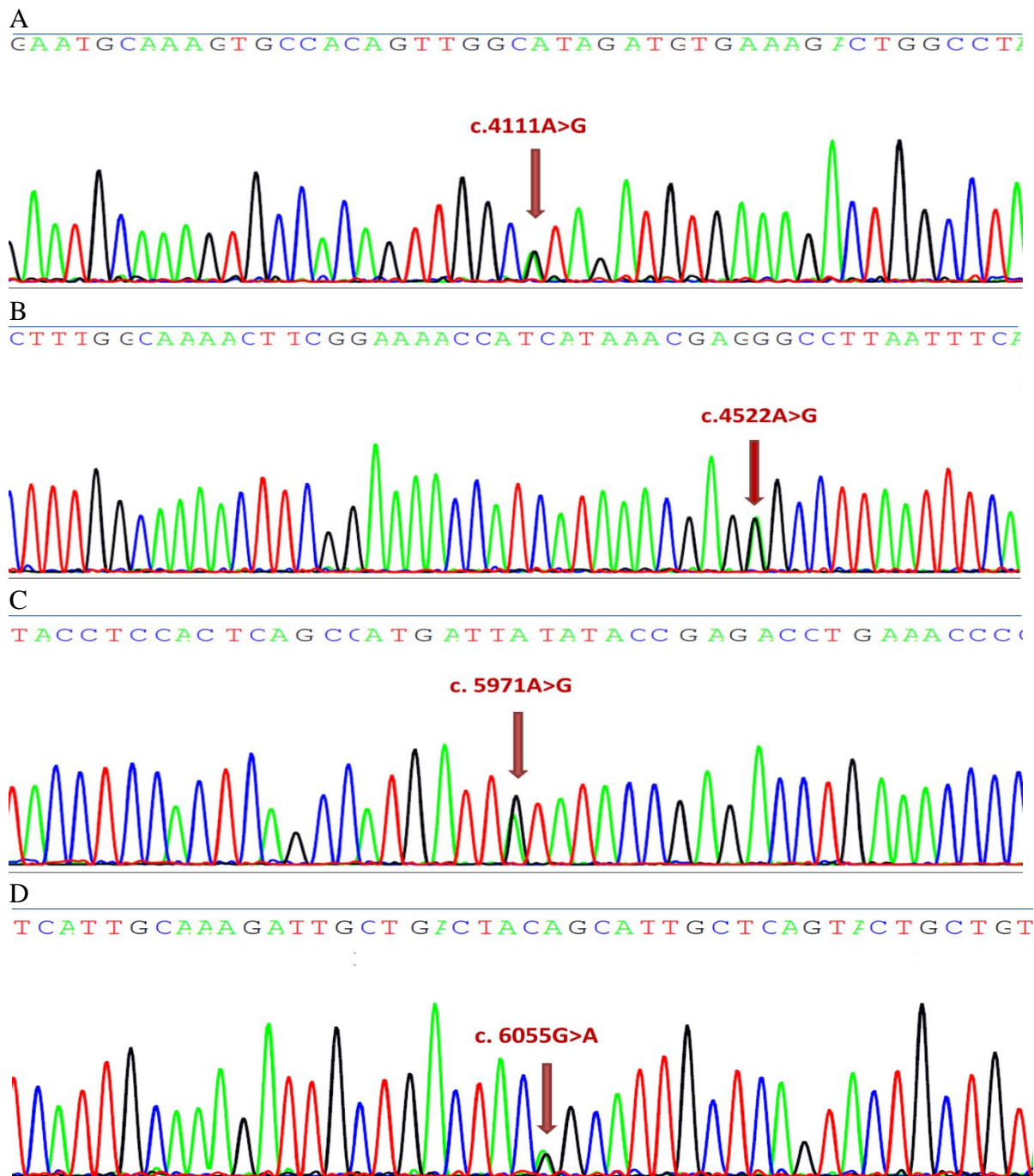
U subgrupi od 232 bolesnika analiza je proširena na egzone 24, 25, 29, 38 i 40, kao i egzon/intron granice *LRRK2* gena. Navedenu subgrupu su činili bolesnici sa početkom bolesti posle 50. godine i/ili sa pozitivnom porodičnom anamnezom za PB sa potencijalnim autozomno-dominantnim načinom nasleđivanja. Uključeno je 88 (37,9%) bolesnica i 144 (62,1%) bolesnika, tako da se odnos od 1,6 (m:ž) nije značajno razlikovao od predhodne grupe. Prosečna starost na početku bolesti je bila 58,4 godine ( $\pm 11,1$  godina; opseg od 31 do 79 godina).

Kod 143 kontrolnih subjekata starijih od 50 godina i bez neuroloških smetnji, vršena je analiza egzona 29 i 31, kao i egzon/intron granica *LRRK2* gena, u kojima su kod bolesnika detektovane mutacije do sada neopisane u literaturi. U ovoj kontrolnoj grupi je regrutovano 66 (46,2%) ispitanika ženskog i 77 (53,8%) ispitanika muškog pola. Svi ispitanici su usmeno deklarirali svoje etničko poreklo kao srpsko.

#### 4.1.2. Distribucija promena u sekvenci *LRRK2* gena

U kodirajućim regionima *LRRK2* gena detektovane su četiri heterozigotne supstitucije promenjenog smisla: c.4111A>G (p.Ile1371Val), c.4522A>G (p.Ser1508Gly), c.5971A>G (p.Ile1991Val) i c.6055G>A (p.Gly2019Ser) kod 4 nesrodna bolesnika (Tabela

14). Elektroferogrami koji obuhvataju delove sekvence *LRRK2* gena u okviru kojih se nalaze navedene promene su prikazani na Slici 16.



Slika 16. Elektroferogrami koji prikazuju promene u kodirajućim regionima *LRRK2* gena. A- supstitucija u egzonu 29, B- supstitucija u egzonu 31, C- supstitucija u egzonu 41, D- supstitucija u egzonu 41.



Tabela 14. Detektovane promene u kodirajućim regionima *LRRK2* gena

Nukleotidna promena	Egzon	Aminokiselinska promena	Domen proteina	Referentni broj	Broj bolesnika
c.4111A>G	29	Ile1371Val	ROC	rs17466213	1
c.4522A>G	31	Ser1508Gly	ROC	nova	1
c.5971A>G	41	Ile1991Val	kinazni	nova	1
c.6055G>A	41	Gly2019Ser	kinazni	rs34637584	1

Promene c.6055G>A i c.4111A>G su poznate patogene mutacije, dok su c.4522A>G i c.5971A>G nove promene, prema dostupnim podacima u literaturi. Ni jedna od novih mutacija nije navedena u bazama podataka dbSNP142 (Sherry et al., 2001) i 1000 Genomes (1000 Genomes Project Consortium, 2012). *In silico* analiza je definisala ove promene kao patogene u po 3 programa, i pretpostavila da ne dovode do alternativnog iskrajanja egzona. Rezultati softverske predikcije su prikazani u Tabeli 15. Članovi porodice bolesnika sa novim mutacijama nisu bili dostupni za segregacionu analizu. Nijedna od novih detektovanih promena kodirajuće sekvence nije detektovana analizom 286 kontrolnih hromozoma.

Tabela 15. Rezultati softverske predikcije za nove variante detektovane u kodirajućim sekvencama *LRRK2* gena

programi za predikciju	p.S1508G	p.I1991V
<b>MutationTaster</b>	patogeno (pouzdanost 75.9%)	patogeno (pouzdanost 99.99%)
<b>PolyPhen-2</b>	verovatno štetno (0.979 <sup>1</sup> )	moguće štetno (0.846 <sup>1</sup> )
<b>PROVEAN</b>	neutralno (-2,14 <sup>2</sup> )	neutralno (-0,29 <sup>2</sup> )
<b>SNPs&amp;GO</b>	neutralno (RI 6 <sup>3</sup> )	neutralno (RI 6 <sup>3</sup> )
<b>SIFT</b>	štetno (0.011 <sup>4</sup> )	podnošljivo (0,435 <sup>4</sup> )
<b>MutPred</b>	verovatnoća patogenosti 0.662 moguća hipoteza – nema	verovatnoća patogenosti 0.629 moguća hipoteza – gubitak stabilnosti

<sup>1</sup>verovatnoća štetnosti promene; <sup>2</sup>vrednosti manje od -2,5 se smatraju patogenim; <sup>3</sup>RI-indeks pouzdanosti (eng. *reliability index*, od 0 – nepouzđano do 10 – pouzđano);

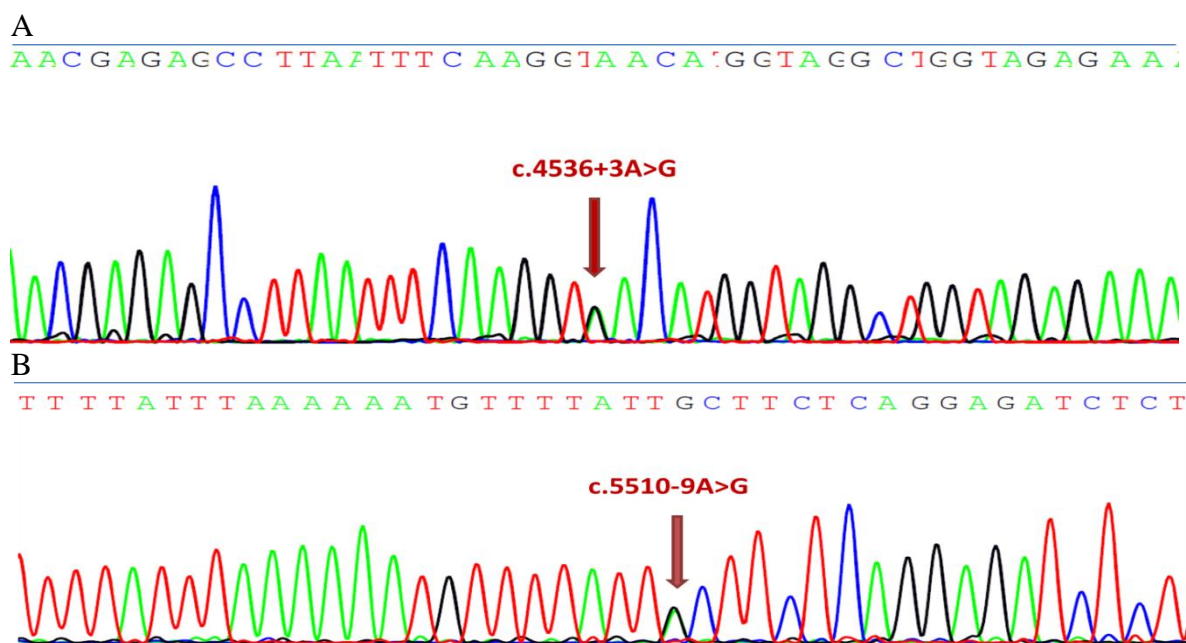
<sup>4</sup>vrednosti manje od 0,05 se smatraju patogenim.

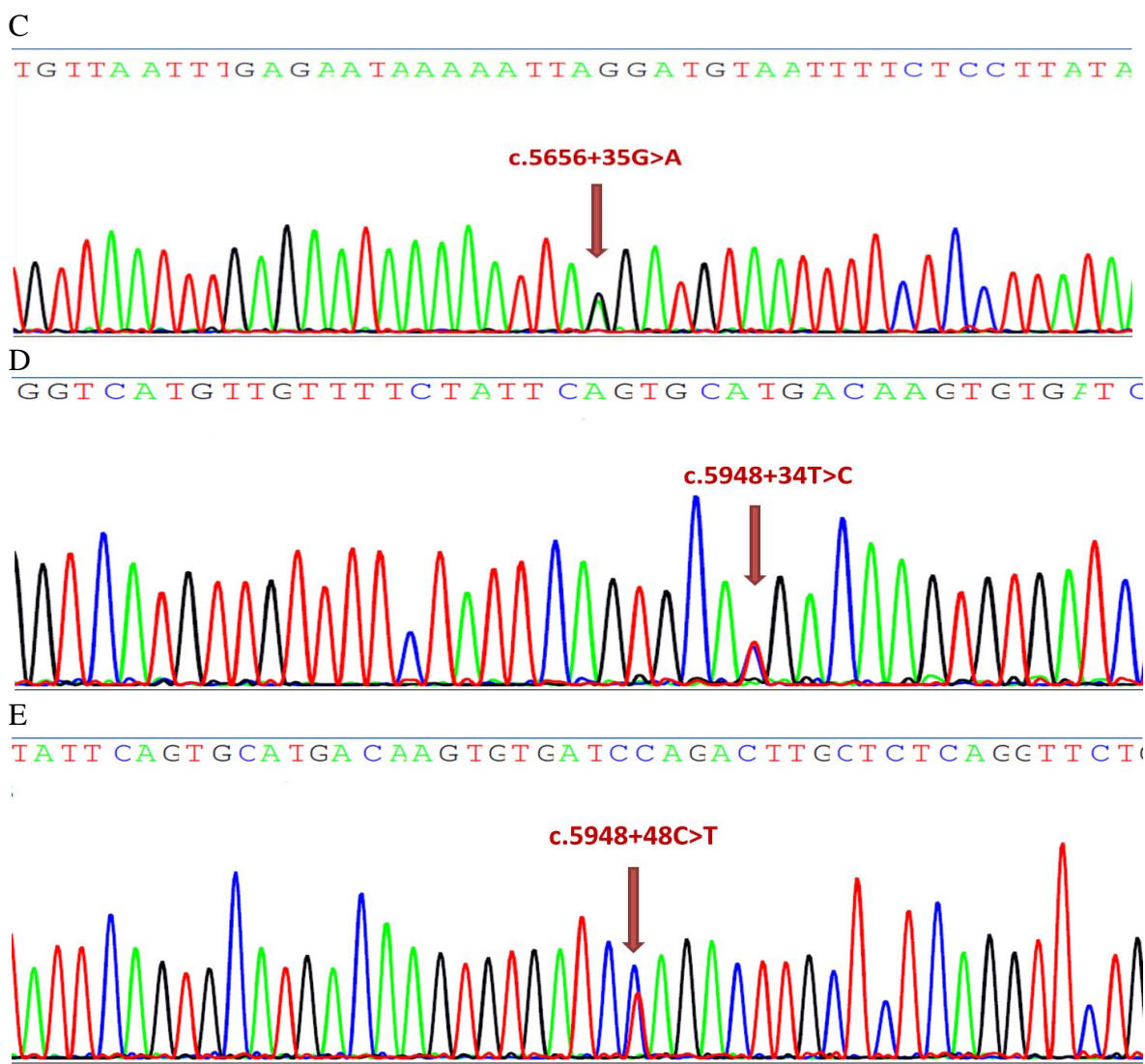
Osim promena u kodirajućim regionima *LRRK2* gena, detektovano je i 5 promena u nekodirajućim regionima gena: c.4536+3A>G, c.5510-9A>G, c.5656+35G>A, c.5948+34T>C i c.5948+48C>T (Tabela 16.).

Tabela 16. Detektovane promene u nekodirajućim regionima *LRRK2* gena

Nukleotidna promena	Pozicija	g.DNA	Referentni broj	Broj bolesnika
<b>c.4536+3A&gt;G het</b>	intron 31	g.113909A>G	rs41286476	2
<b>c.5510-9A&gt;G het</b>	intron 37	g.126408A>G	rs41286460	1
<b>c.5656+35G&gt;A het</b>	intron 38	g.126598G>A	rs17484342	19
<b>c.5656+35G&gt;A hom</b>	intron 38	g.126598G>A	rs17484342	2
<b>c.5948+34T&gt;C het</b>	intron 40	g.138448T>C	rs17444152	2
<b>c.5948+48C&gt;T het</b>	intron 40	g.138462C>T	rs2404834	41

Elektroferogrami koji obuhvataju delove sekvence *LRRK2* gena u okviru kojih se nalaze navedene promene su prikazani na Slici 17.





Slika 17. Elektroferogrammi koji prikazuju promene u nekodirajućim regionima *LRRK2* gena. A – supstitucija u intronu 31, B – supstitucija u intronu 37, C – supstitucija u intronu 38, D, E – supstitucije u intronu 40.

Promena c.5510-9A>G je detektovana kod jednog bolesnika, dok je promena c.5948+34T>C detektovana kod 2 nesrodna bolesnika. Varijanta c.5656+35G>A je detektovana kod 21, a c.5948+48C>T je detektovana kod 41 bolesnika u heterozigotnom obliku. Promena c.4536+3A>G je detektovana kod 2 nesrodna bolesnika, kao i kod 3 kontrolna subjekta. Softverska predikcija je okarakterisala ovu promenu kao patogenu, jer dovodi do ukidanja mesta za iskrajanje egzona (Tabela 17.)

Tabela 17. Rezultati softverske predikcije za varijantu detektovanu u intronu 31 *LRRK2* gena

Promena	MutationTaster	NN splice	NetGene2
<b>c.4536+3A&gt;G</b>	patogeno (pouzdanost 100%)	dovodi do alternativnog iskrajanja egzona	dovodi do alternativnog iskrajanja egzona

#### 4.1.3. Fenotipske karakteristike nosilaca *LRRK2* mutacija

U našoj studiji je ukupno detektovano 6 bolesnika sa patogenim ili potencijalno patogenim promenama u *LRRK2* genu. Detaljnije demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa detektovanim mutacijama prikazane su u Tabeli 18.

Tabela 18. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa promenama u sekvenci *LRRK2* gena

Bolesnik	L1	L2	L3	L4	L5	L6
<b>Promena</b>	I1371V	S1508G	c.4536 +3A>G	c.4536 +3A>G	I1991E	G2019S
<b>Pol</b>	ženski	ženski	ženski	ženski	muški	ženski
<b>Godine početka bolesti</b>	57	66	49	62	41	56
<b>Godine na pregledu</b>	62	68	50	71	52	58
<b>Trajanje bolesti</b>	5	2	1	9	11	2
<b>Porodična istorija</b>	pozitivna	negativna	negativna	negativna	negativna	pozitivna
<b>Prva zahvaćena strana</b>	leva	leva	desna	desna	leva	leva
<b>Prvi zahvaćeni ekstremitet</b>	noga	ruka	ruka	noga	ruka	ruka
<b>Prvi simptomi</b>	tremor	bradikine- zija	problem u pisanju	rigiditet	tremor	bradikine- zija
<b>Asimetrični parkinsonizam</b>	da	da	da	da	da	da
<b>Odgovor na dopamimometike</b>	4	4	4	1	1	4

Prosečne godine početka bolesti bolesnika sa detektovanim mutacijama u kodirajućim regionima *LRRK2* gena su bile 55 ( $\pm 10,4$ ; raspon: 41 – 66). Ukoliko se uključe i dva bolesnika sa promenom na +3 poziciji u intronu 31, prosečne godine početka su 55,2 ( $\pm 9$ ; raspon: 41 – 66). Statistička analiza primenom analize varijanse nije pokazala statistički značajnu razliku u godinama početka bolesti kod bolesnika sa mutacijama u odnosu na bolesnike bez detektovanih mutacija u *LRRK2* genu ( $p=0,607$ ). Pored toga, razlike nisu utvrđene ni u okviru drugih analiziranih kliničkih karakteristika kao što su prvi simptomi ( $p=0,819$ ), asimetrična pojava prvih simptoma ( $p=1$ ), trajanje bolesti ( $p=0,487$ ) i porodična istorija ( $p=0,609$ ). Statistički značajna razlika je pokazana u odnosu polova. Primenom Fisherovog testa egzaktne verovatnoće je utvrđeno da je zastupljenost muškog pola značajno manja kod nosilaca mutacija u odnosu na bolesnike bez mutacija, ( $p=0,034$ ). Ovakvi rezultati su potvrđeni i logističkom regresionom analizom (OR 0,122; CI 0,014-1,056).

## **4.2. Analiza autozomno-dominantne Parkinsonove bolesti: *PARK17/VPS35***

### **4.2.1. Demografska i klinička karakterizacija ispitanika**

Grupa bolesnika koja je testirana na prisustvo mutacije c.1858G>A (p.Asp620Asn) u petnaestom egzonu *VPS35* gena je bila identična kao i grupa testirana na prisustvo mutacija u *LRRK2* genu.

Demografske i kliničke karakteristike ove grupe koja uključuje 496 bolesnika su opisane u poglavlju 4.1.1.

#### **4.2.2. Distribucija promena u sekvenci VPS35 gena**

Mutacija c.1858G>A (p.Asp620Asn) nije detektovana ni kod jednog od testiranih bolesnika. Takođe, u sekvenciranom egzonu 15 nije detektovana ni jedna promena sekvence, kao ni u egzon-intron granicama obuhvaćenim analizom.

### **4.3. Analiza autozomno-recesivne Parkinsonove bolesti: *PARK2/Parkin***

#### **4.3.1. Demografska i klinička karakterizacija ispitanika**

U analizu *PARK2* gena je ukupno uključeno 225 bolesnika sa kliničkom dijagnozom PB. Inkluzioni kriterijum za testiranje na *PARK2* mutacije su bile godine početka bolesti pre 50 godine života i/ili pozitivna porodična anamneza, koja ukazuje na potencijalno autozomno-recesivno nasleđivanje bolesti. U analiziranoj grupi bolesnika odnos polova je bio 143:82 (muškarci:žene). Tačne godine pojave prvih simptoma su bile dostupne za 219 bolesnika. Raspon godina početka bolesti je bio od 17 do 78 godina, dok su prosečne godine početka bolesti bile približno 43,7 ( $\pm 11,2$ ). Podaci o pojavi simptoma PB u porodici bolesnika su dobijeni autoanamnestički i prema tim podacima u ispitivanje je uključeno 55 familijarnih slučajeva PB.

Asimetričnu pojavu prvih simptoma je prijavljivalo 192 (93,7%) bolesnika, pri čemu je kod istog broja bolesnika bolest najpre zahvatila desnu, odnosno levu stranu tela (po 96 bolesnika). Obostrana pojava simptoma je registrovana kod 13 bolesnika, dok za njih 20 ovaj podatak nije bio dostupan. Prvi simptomi su najčešće zahvatali gornje

ekstremitete (158 bolesnika; 77,8%) dok su kod 29 (14,9%) bolesnika bili istovremeno zahvaćeni i gornji i donji ekstremitet iste strane, a kod 16 (7,9%) samo donji. Tip i učestalost prvih simptoma su predstavljeni u Tabeli 19.

Kod svih navedenih bolesnika vršeno je direktno sekvenciranje svih 12 kodirajućih egzona ovog gena kao i egzon/intron granica u cilju detekcije tačkastih mutacija kao i malih insercija i delecija. U cilju detekcije velikih duplikacija i delecija kodirajućih regiona *PARK2* gena, primenjena je MLPA metoda.

Tabela 19. Zastupljenost i distribucija inicijalnih simptoma kod bolesnika testiranih na prisustvo mutacija u *Parkin* genu.

<b>Jedan inicijalni simptom</b>	<b>Broj bolesnika</b>	<b>Dva ili više inicijalnih simptoma</b>	<b>Broj bolesnika</b>
<b>tremor</b>	88	rigiditet i bradikinezija	3
<b>bradikinezija</b>	63	rigiditet i tremor	2
<b>rigiditet</b>	27	bradikinezija i tremor	2
<b>bol</b>	9	bradikinezija i bol	1
<b>problemi u pisanju</b>	3	tremor i problemi sa hodom	0
<b>problemi sa hodom</b>	4	rigiditet,bradikinezija i tremor	1

#### 4.3.2. Distribucija promena u sekvenci *Parkin* gena

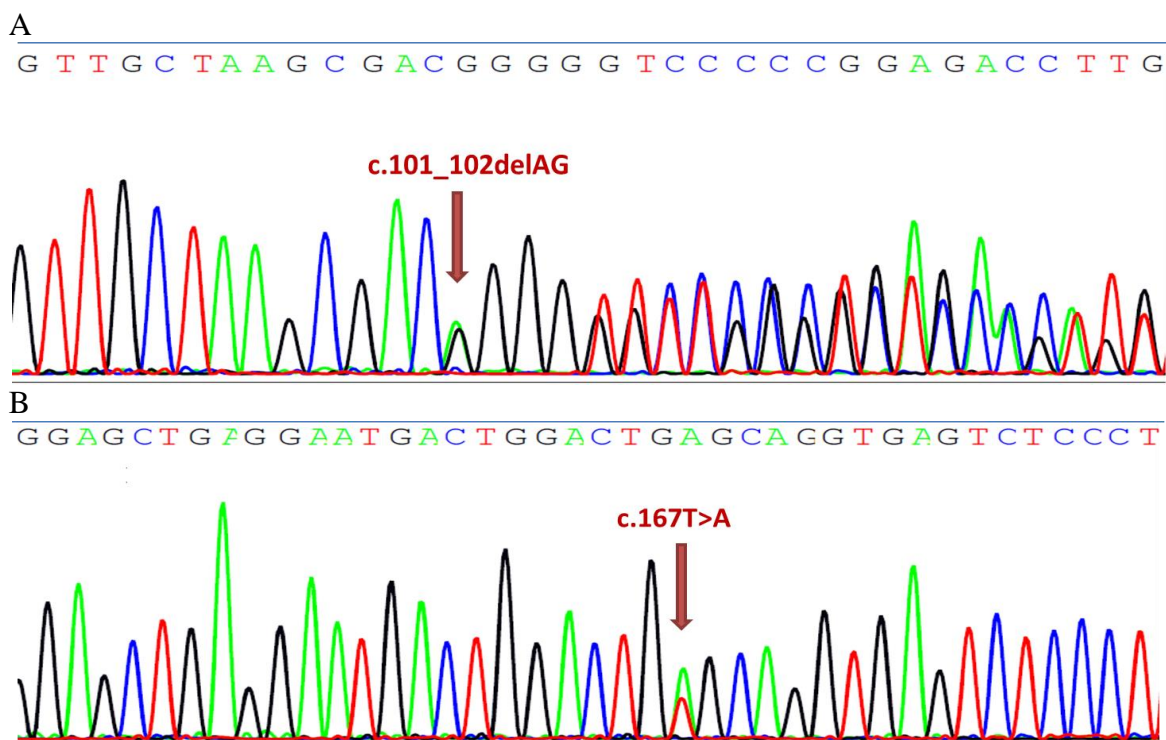
U kodirajućim regionima *PARK2* gena detektovano je 13 različitih heterozigotnih promena: c.101\_102delAG, c.167T>A, c.245C>A, c.398\_399insACC, c.469G>A, c.600G>A, c.583G>A, c.741C>T, c.758G>A, c.823C>T, c.1138G>C, c.1180G>A i c.1310C>T (Tabela 20).

Tabela 20. Detektovane promene u kodirajućim regionima *PARK2* gena

Nukleotidna promena	Egzon	Aminokiselinska promena	Domen proteina	Referentni broj	Broj bolesnika
<b>c.101_102delAG</b>	2	p.Gln34ArgfsTer5	UBL	rs55777503	1
<b>c.167T&gt;A</b>	2	p.Val56Glu	UBL	rs137853059	1
<b>c.245C&gt;A</b>	3	p.Ala82Glu	L1	rs55774500	1
<b>c.399_400insCCA</b>	3	p.Pro133dup	L1	HGMD ID CI094593	1
<b>c.469G&gt;A</b>	4	p. Val157Met	L1	nije opisana	1
<b>c.500G&gt;A</b>	4	p. Ser167Asn	L1	rs1801474	10
<b>c.583G&gt;A</b>	5	p.Glu195Lys	L1	nije opisana	1
<b>c.741C&gt;T</b>	7	p.Pro247Pro	ring 1	rs149749354	1
<b>c.758G&gt;A</b>	7	p.Cys253Tyr	ring 1	HGMD ID CM030927	1
<b>c.823C&gt;T</b>	7	p.Arg275Trp	ring 1	rs34424986	2
<b>c.1138G&gt;C</b>	10	p.Val380Leu	L3	rs1801582	64 3
<b>c.1180G&gt;A</b>	11	p.Asp394Asn	L3	rs1801334	6
<b>c.1310C&gt;T</b>	12	p. Pro437Leu	ring 2	rs149953814	2

Dve promene pogađaju aminokiseline u okviru UBL regiona proteina i locirane su u egzonu dva i detektovane su kod dva bolesnika. Jedna promena (c.101\_102delAG) dovodi do promene okvira čitanja i prerane terminacije sinteze proteina, dok druga promena (c.167T>A) dovodi do zamene amino kiseline valin na poziciji 56 glutaminskom kiselinom. Ove promene su već opisane u literaturi i okarakterisane kao patogene. U ovom istraživanju nosioci ovih mutacija su ujedno nosioci i druge mutacije u *Parkin* genu. Elektroferogrami koji obuhvataju delove sekvence *PARK2* gena u okviru kojih se nalaze navedene promene su prikazani na Slici 18.





Slika 18. Elektroferogrami koji prikazuju promene u kodirajućim regionima *Parkin* gena koje pogađaju aminokiseline u UBL regionu proteina. A – delecija u egzonu 2, B – supstitucija u egzonu 2.

Opisano je i nekoliko promena koje pogađaju aminokiseline u L1 regionu *Parkin* proteina. Jedina supstitucija koja je prema literaturi potencijalno patogena (c.245C>A) je identifikovana kod jednog bolesnika koji je heterozigotni nosilac mutacija u *Parkin* genu. Pored ove mutacije, kod jednog bolesnika je detektovana insercija 3 nukleotida (c.398\_399insACC), koja dovodi do ugradnje dodatnog prolina u proteinu. Ovaj bolesnik nije bio nosilac druge mutacije u *Parkin* genu. Promena c.500G>A je detektovana kod 10 nesrodnih bolesnika i prema literaturi je okarakterisana kao polimorfizam. U ovom domenu su nađene i dve promene koje do sada nisu opisane u literaturi (c.469G>A i c.583G>A) i koje su prema softverskoj predikciji okarakterisane kao benigne (Tabela 21.).

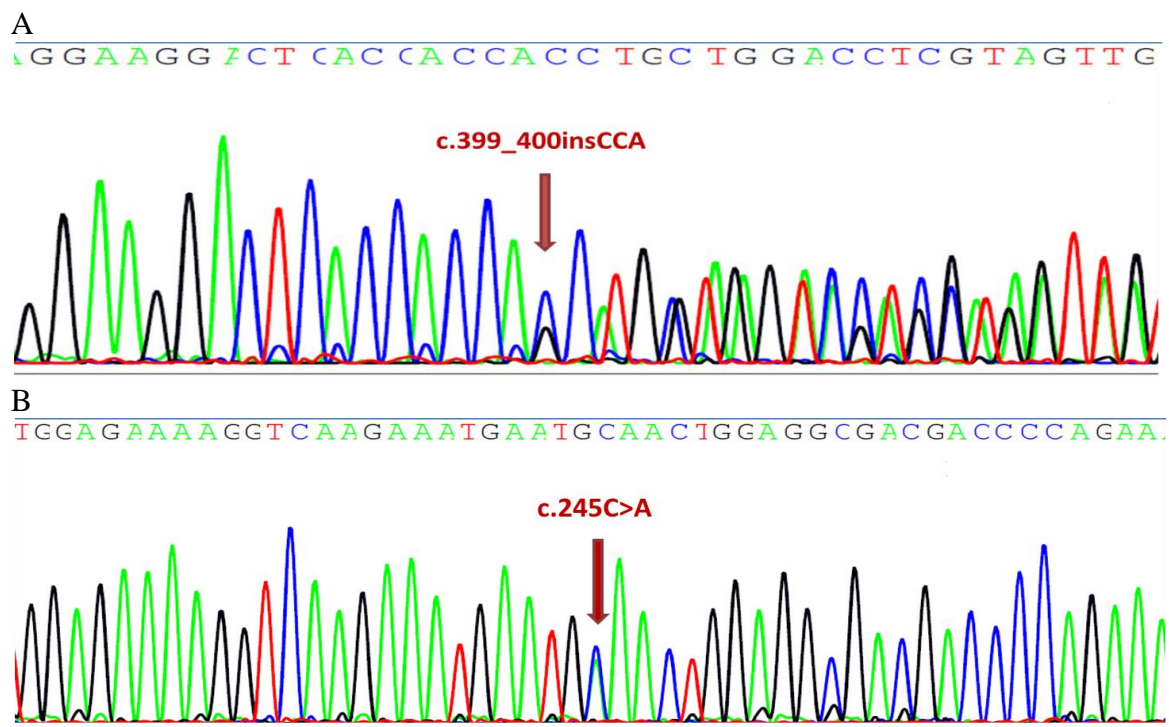
Tabela 21. Rezultati softverske predikcije za nove varijante detektovane u kodirajućim sekvencama *Parkin* gena

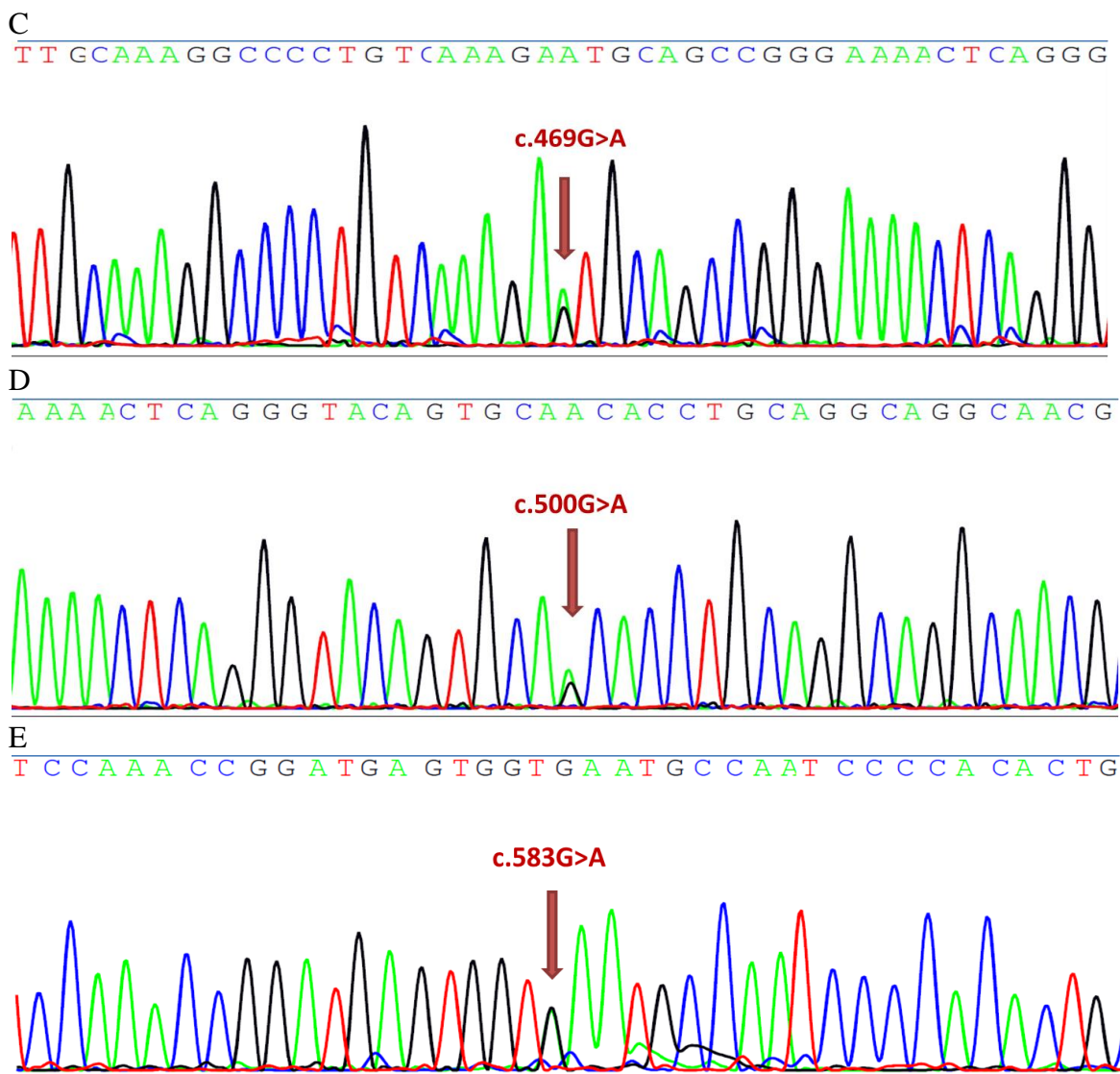
programi za predikciju	p. Val157Met	p.Glu195Lys
<b>MutationTaster</b>	polimorfizam (pouzdanost 99.96%)	polimorfizam (pouzdanost 99.99%)
<b>PolyPhen-2</b>	verovatno patogeno (0,992 <sup>1</sup> )	benigno (0.002 <sup>1</sup> )
<b>PROVEAN</b>	neutralno (-2.28 <sup>2</sup> )	neutralno (-0.69 <sup>2</sup> )
<b>SNPs&amp;GO</b>	neutralno (RI 2 <sup>3</sup> )	neutralno (RI 4 <sup>3</sup> )
<b>SIFT</b>	štetno (0,002 <sup>4</sup> )	podnošljivo (0,871 <sup>4</sup> )
<b>MutPred</b>	verovatnoća patogenosti 0,331 moguća hipoteza – nema	verovatnoća patogenosti 0,367 moguća hipoteza – nema

<sup>1</sup>verovatnoća štetnosti promene; <sup>2</sup> vrednosti manje od -2,5 se smatraju patogenim; <sup>3</sup>RI- indeks pouzdanosti (eng. *reliability index*, od 0 – nepouzđano do 10 – pouzđano);

<sup>4</sup>vrednosti manje od 0,05 se smatraju patogenim.

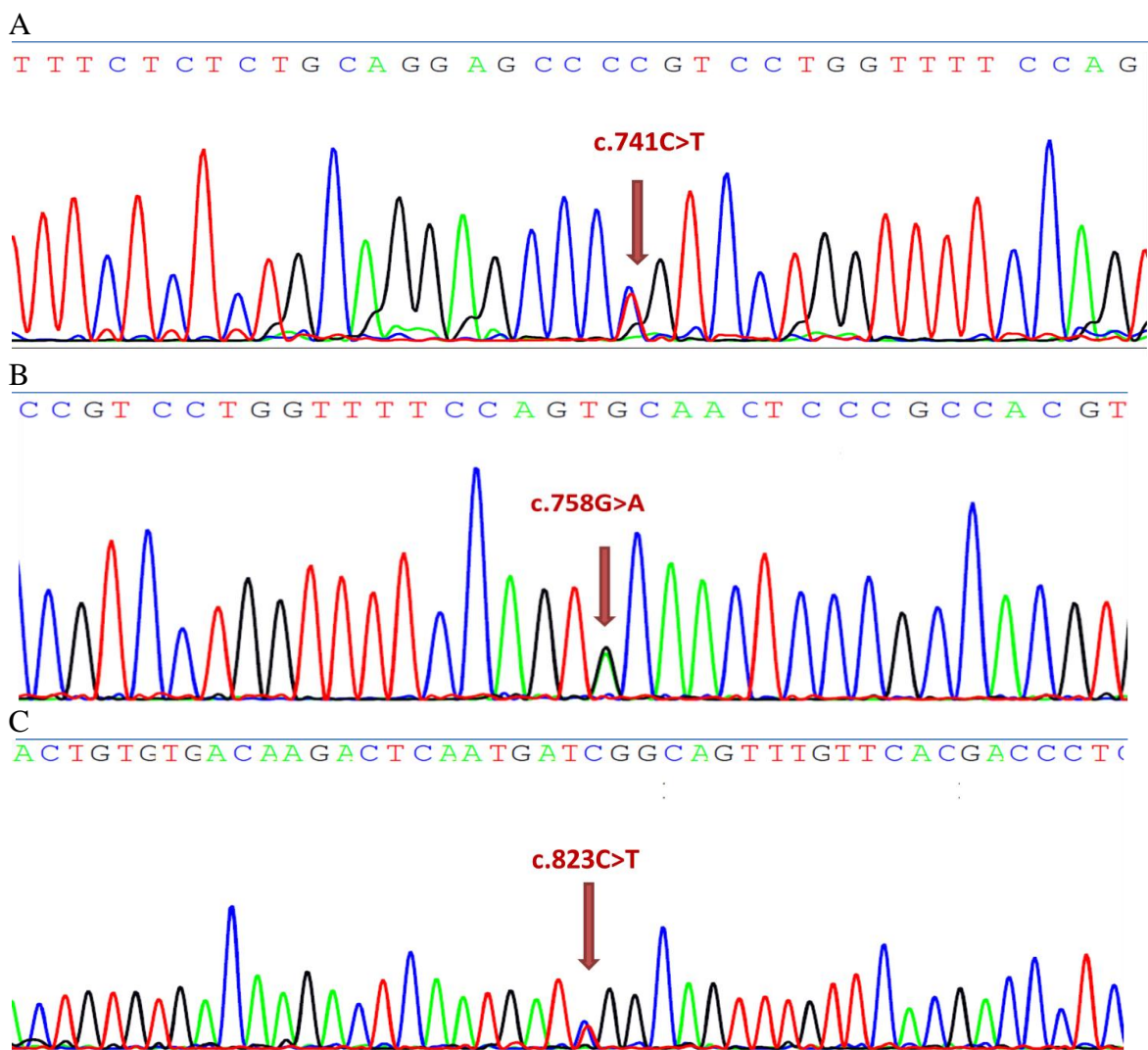
Elektroferogrami koji obuhvataju delove sekvence *PARK2* gena u okviru kojih se nalaze navedene promene su prikazani na Slici 19.





Slika 19. Elektroferogrami koji prikazuju promene u kodirajućim regionima *Parkin* gena koje pogađaju aminokiseline u L1 regionu proteina. A – insercija u egzonu 3, B – supstitucija u egzonu 3, C, D – supstitucija u egzonu 4, E – dupstitucija u egzonu 5.

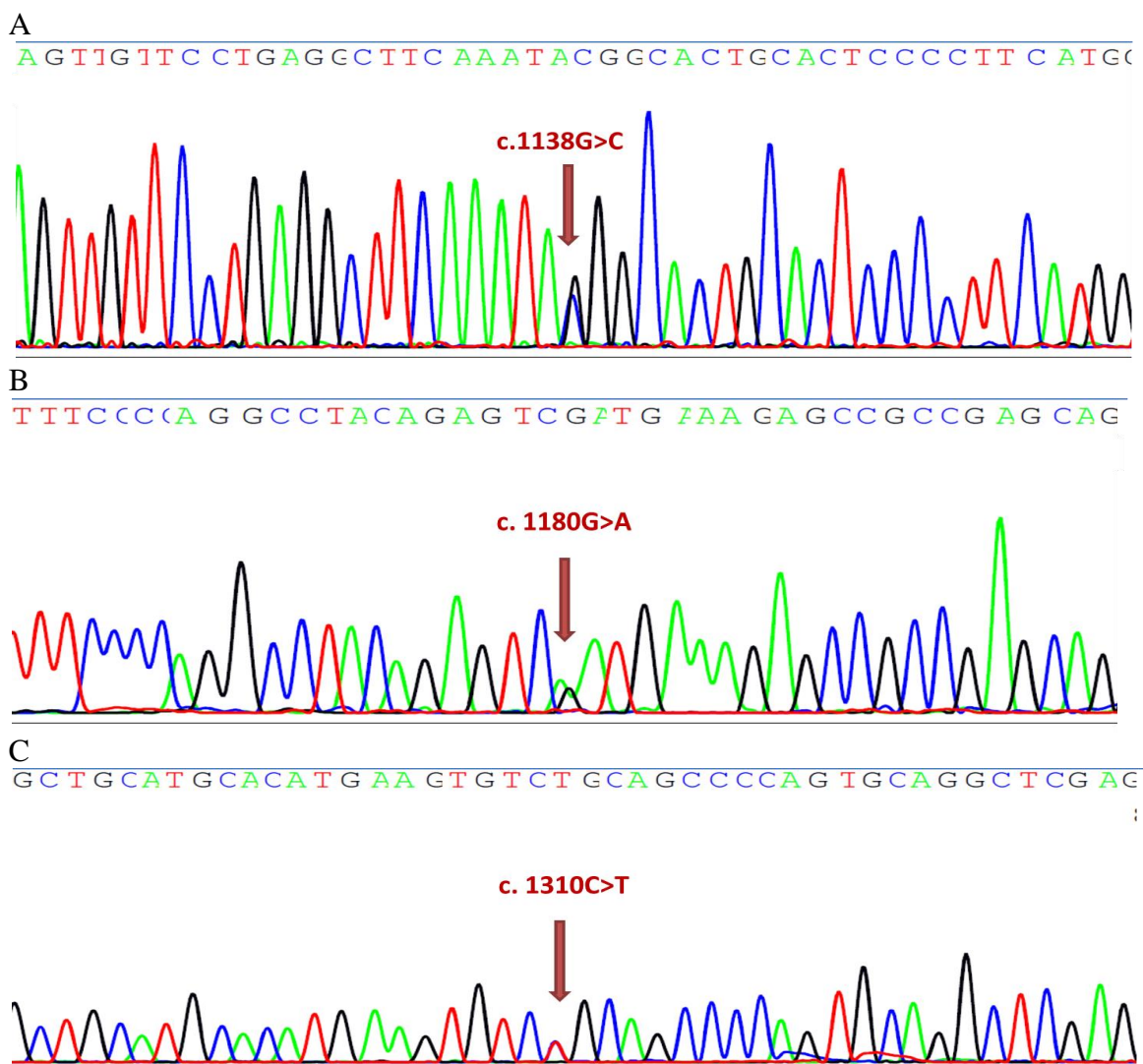
U egzonu sedam su opisane 3 različite promene kod 4 bolesnika koje pogađaju aminokiseline u RING1 domenu proteina (Slika 20.) Promena c.741C>T ne dovodi do zamene aminokiseline, dok su promene c.758G>A i c.823C>T opisane u literaturi kao potencijalno patogene. Mutacija c.758G>A je detektovana kod jednog bolesnika koji je nosilac i mutacije u egzonu 2, dok je mutacija c.823C>T nađena kod 2 nesrodna bolesnika koji ne poseduju drugu mutaciju u *Parkin* genu.



Slika 20. Elektroferogrami koji prikazuju promene u kodirajućim regionima *Parkin* gena koje pogađaju aminokiseline u RING1 regionu proteina. A – sinonimna promena u egzonu 7, B, C – supstitucije u egzonu 7.

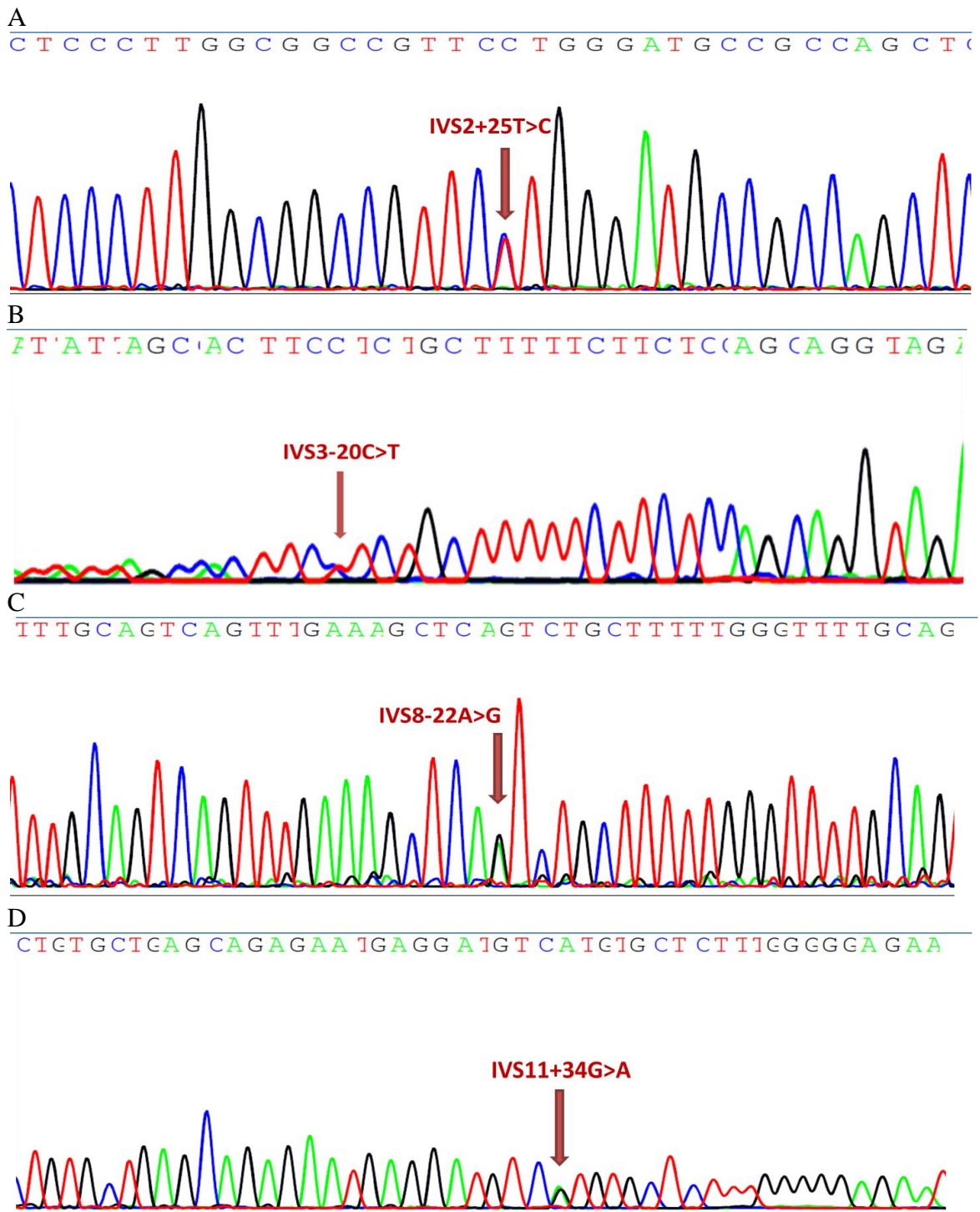
U svakom od egzona 10, 11 i 12 je detektovana po jedna supstitucija koja je već opisana u literaturi (Slika 21). Promena u egzonu 10 (c.1138G>C) je čest polimorfizam koji je u heterozigotnom obliku nađen kod 64 bolesnika, a kod 3 u homozigotnom. U egzonu 11 je takođe opisan polimorfizam c.1180G>A kod 6 bolesnika, dok je promena u egzonu 12 (c.1310C>T) opisana u bazama kao potencijalno patogena i detektovana kod 2 nesrodna bolesnika.





Slika 21. Elektroferogrami koji prikazuju promene u kodirajućim regionima *Parkin* gena koje pogađaju aminokiseline u L2 i RING2 regionu proteina. A – supstitucija u egzonu 10, B – supstitucija u egzonu 11, C – supstitucija u egzonu 12.

U nekodirajućim regionima su detektovane sledeće promene: c.171+25T>C, c.413-20T>C, c.934-22A>G i c.1285+34G>A, a delovi elektroferograma na kojima se one vide prikazani su na Slici 22.

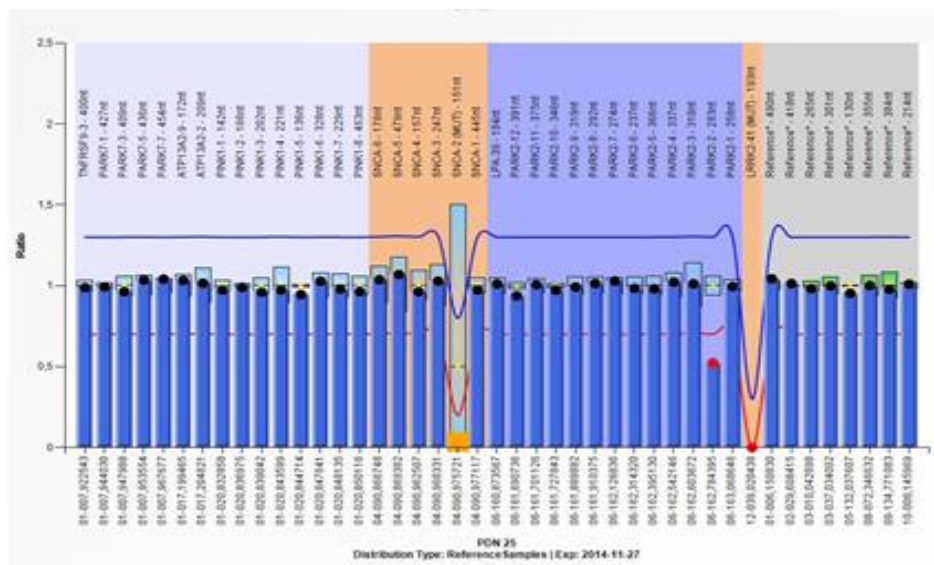


Slika 22. Promene u nekodirajućim regionima *Parkin* gena. A, B – supstitucije u intronu 2; C – supstitucija u intronu 7; D – supstitucija u intronu 11.

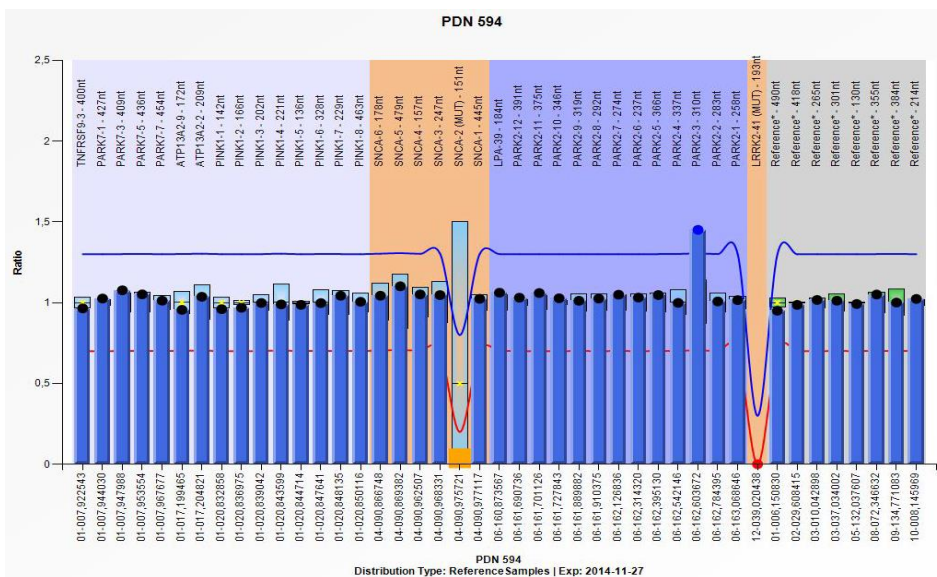
### 4.3.3. Distribucija promena u broju kopija *Parkin* gena

Promene u broju kopija kodirajućih regiona *Parkin* gena koje su detektovane primenom jednog od dva SALSA MLPA kita (P051 ili P052) su verifikovane drugim kitom iz istog uzorka DNK, kao i ponovnom analizom duplikata uzorka primenom oba navedena kita.

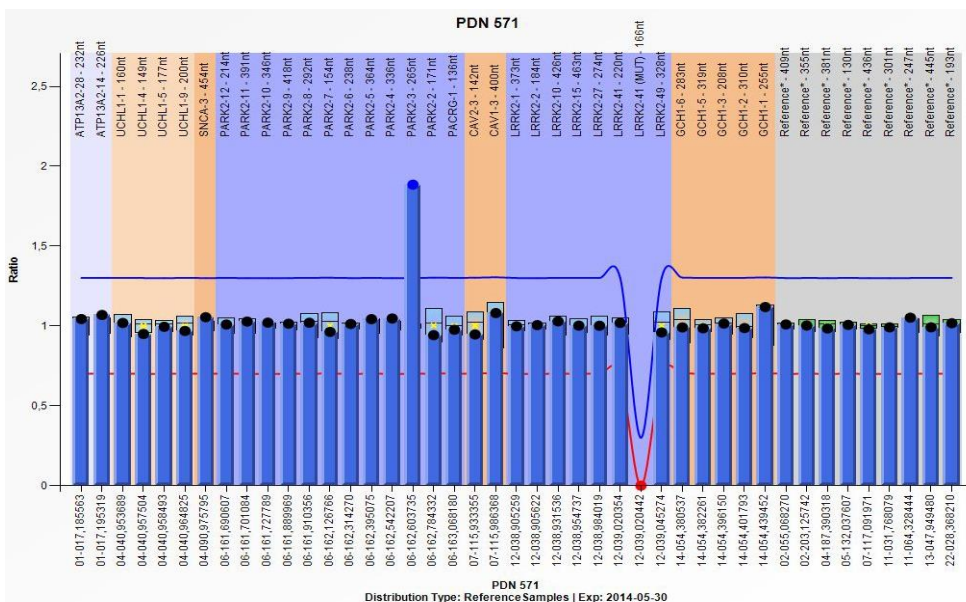
Kao rezultat MLPA analize, detektovane su delecija egzona 2, delecija egzona 2-3, duplikacija egzona 3, duplikacija egzona 4, duplikacija egzona 4-7, duplikacija egzona 5-7, kao i triplikacija egzona 3. Od toga, kao heterozigotne promene su detektovane delecija egzona 2 (Slika 23.), duplikacija egzona 3 (Slika 24.), triplikacija egzona 3 (Slika 25.) i duplikacija egzona 4 (Slika 26.).



Slika 23. Heterozigotna delecija egzona 2.

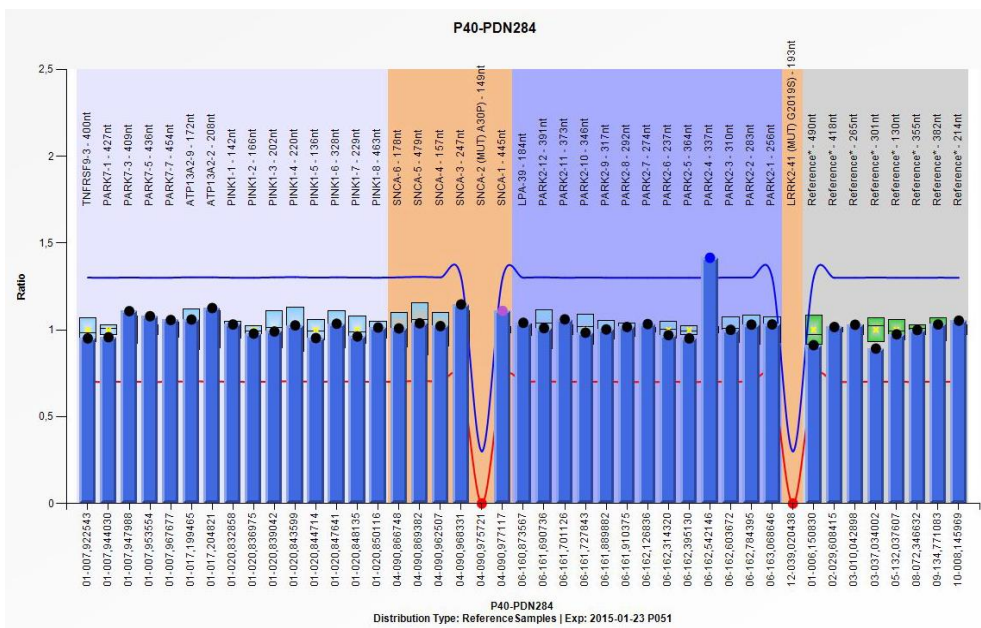


Slika 24. Heterozigotna duplikacija egzona 3.



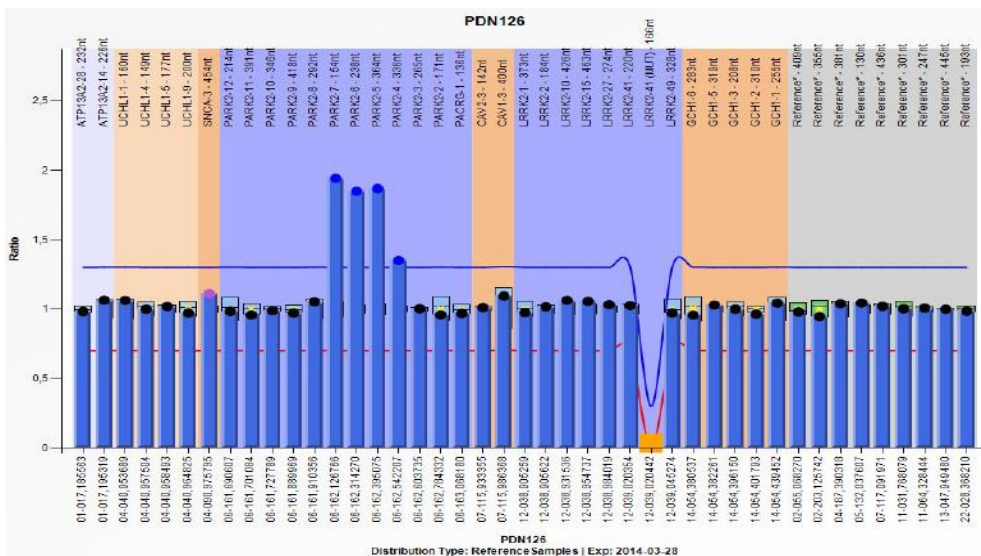
Slika 25. Heterozigotna triplikacija egzona 3.





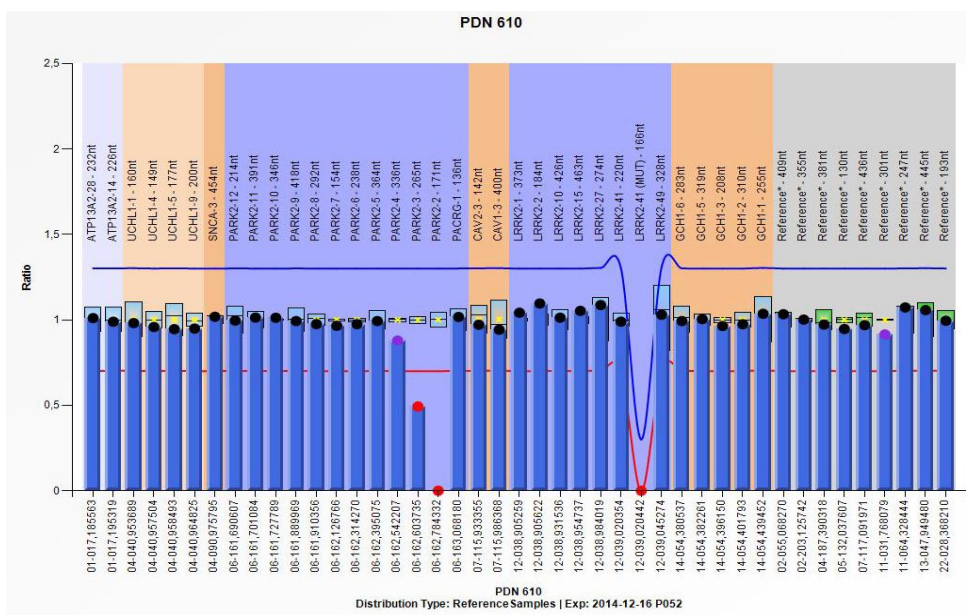
Slika 26. Heterozigotna duplikacija egzona 4.

Kod dva bolesnika su detektovane homozigotne promene u broju kopija kodirajućih regiona. Kod jednog bolesnika detektovana je duplikacija regiona koji obuhvata egzone 4, 5, 6 i 7, kao i duplikacija regiona koji obuhvata egzone 5, 6 i 7 (Slika 27).



Slika 27. Heterozigotna duplikacija egzona 4 i homozigotna duplikacija egzona 5, 6 i 7.

Kod jednog bolesnika je detektovana homozigotna delecija egzona 2 i heterozigotna delecija egzona 3 (Slika 28).



Slika 28. Homozigotna delecija egzona 2 i heterozigotna delecija egzona 3.

#### 4.3.4. Fenotipske karakteristike nosilaca *Parkin* mutacija

Od ukupno testiranih 225 bolesnika sa kliničkom dijagnozom PB, četiri bolesnika su imala po 2 mutacije u *Parkin* genu (1,78%). Kod dva bolesnika su obe mutacije bile izmene u broju kopija kodirajućih regiona gena, kod jednog bolesnika je jedna mutacija bila izmena broja kopija kodirajućih regiona, dok je druga predstavljala promenu u sekvenci kodirajućeg regiona, i kod jednog bolesnika su obe mutacije bile promene u sekvenci kodirajućih regiona. Dostupni demografski i klinički podaci navedenih bolesnika su prikazani u Tabeli 22.

Tabela 22. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa 2 mutacije u *Parkin* genu

<b>Bolesnik</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>	<b>P3</b>	<b>P4</b>
<b>Promena I</b>	duplikacija egzona 4– 7	duplikacija egzona 3	delecija egzona 2-3	c.167T>A
<b>Promena II</b>	duplikacija egzona 5– 7	c.101_102delAG	delecija egzona 2	c.758G>A
<b>Pol</b>	muški	muški	ženski	ženski
<b>Godine početka bolesti</b>	48	27	18	28
<b>Godine na pregledu</b>	58	31	48	34
<b>Trajanje bolesti</b>	10	4	30	6
<b>Porodična istorija</b>	pozitivna	negativna	negativna	negativna
<b>Prva zahvaćena strana</b>	obostrano	desna	na	desna
<b>Prvi zahvaćeni ekstremitet</b>	ruka	ruka i noga	ruka	noga
<b>Prvi simptomi</b>	tremor	tremor	rigiditet	otežan hod
<b>Asimetrični parkinsonizam</b>	da	da	da	da

Osim bolesnika koji su nosioci 2 mutacije u *Parkin* genu, u ovoj studiji je detektovano i 8 bolesnika koji su imali samo po jednu mutaciju već opisanu u literaturi (3,55%). Kod tri bolesnika je bila prisutna heterozigotna promena u broju kopija pojedinačnog egzona, dok je pet bolesnika imalo promene u sekvenci kodirajućih regiona. Dostupni demografski i klinički podaci navedenih bolesnika su prikazani u Tabeli 23. i 24.

Tabela 23. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa po jednom promenom broja kopija kodirajućih sekvenci *Parkin* gena

<b>Bolesnik</b>	<b>P5</b>	<b>P6</b>	<b>P7</b>
<b>Promena</b>	delecija egzona 2	triplikacija egzona 3	duplikacija egzona 4
<b>Pol</b>	muški	ženski	muški
<b>Godine početka bolesti</b>	49	46	48
<b>Godine na pregledu</b>	59	47	51
<b>Trajanje bolesti</b>	10	1	3
<b>Porodična istorija</b>	negativna	negativna	pozitivna
<b>Prva zahvaćena strana</b>	leva	obostrano	obostrano
<b>Prvi zahvaćeni ekstremitet</b>	ruka i noga	ruka i noga	ruka i noga
<b>Prvi simptomi</b>	bradikinezija	bradikinezija	bradikinezija
<b>Asimetrični parkinsonizam</b>	da	da	/

Tabela 24. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa po jednom poznatom mutacijom u kodirajućim sekvencama *Parkin* genu

Bolesnik	P8	P9	P10	P11	P12
<b>Promena</b>	c.245C>A	c.399_400insCCA	c.823C>T	c.823C>T	c.1310C>T
<b>Pol</b>	muški	muški	muški	ženski	ženski
<b>Godine početka bolesti</b>	49	42	27	49	78
<b>Godine na pregledu</b>	66	42	/	63	82
<b>Trajanje bolesti</b>	17godina	6 meseci	/	14godina	4 godine
<b>Porodična istorija</b>	negativna	negativna	negativna	negativna	pozitivna
<b>Prva zahvaćena strana</b>	desna	desna	/	desna	desna
<b>Prvi zahvaćeni ekstremitet</b>	ruka	ruka	/	ruka	ruka
<b>Prvi simptomi</b>	tremor	bradikinezija	/	tremor	tremor
<b>Asimetrični parkinsonizam</b>	da	da	/	da	da

Dva bolesnika su nosioci promene koje nisu do sada opisane u literaturi i čija patogenost nije potvrđena softverskom predikcijom. Ovi bolesnici nisu nosioci druge mutacije i njihove demografske i kliničke karakteristike su navedene u Tabeli 25.

Tabela 25. Demografske i kliničke karakteristike bolesnika sa po 1 novom promenom u *Parkin* genu

Bolesnik	P13	P14
<b>Promena</b>	c.469G>A	c.583G>A
<b>Pol</b>	muški	ženski
<b>Godine početka bolesti</b>	45	43
<b>Godine na pregledu</b>	64	46
<b>Trajanje bolesti</b>	19	3
<b>Porodična istorija</b>	pozitivna	negativna
<b>Prva zahvaćena strana</b>	leva	desna
<b>Prvi zahvaćeni ekstremitet</b>	noga	ruka
<b>Prvi simptomi</b>	tremor	tremor
<b>Asimetrični parkinsonizam</b>	da	da

Prosečne godine početka bolesti nosilaca 2 mutacije u *Parkin* genu su bile 30,3 ( $\pm 12,7$ ; raspon: 18 – 48), a nosilaca jedne mutacije 48,5 ( $\pm 14$ ; raspon: 27 – 78). Kod bolesnika koji nisu imali mutacije u *Parkin* genu prosečne godine početka su iznosile 43,75 ( $\pm 8,1$ ; raspon: 17 – 73). Analiza varijanse uz Bonferoni post-hok test, je pokazala statistički

značajan raniji početak bolesti kod nosilaca 2 mutacije u odnosu na nosioce jedne mutacije ( $p=0,001$ ), kao i u odnosu na bolesnike bez mutacija u *Parkin* genu ( $p=0,005$ ). Heterozigotni nosioci mutacija se nisu razlikovali u godinama početka bolesti od bolesnika bez mutacija ( $p=0,356$ ). Statistički značajne razlike nisu utvrđene kod drugih analiziranih kliničkih i demografskih karakteristika kao što su pol ( $p=0,612$ ), prvi simptomi ( $p=0,271$ ), asimetrični početak bolesti ( $p=0,484$ ) i porodična istorija ( $p=0,991$ ).

## **4.4. Analiza *GBA* gena**

### **4.4.1. Demografska i klinička karakterizacija ispitanika**

Na prisustvo mutacija u odabranim regionima *GBA* gena testirano je 481 bolesnika sa kliničkom dijagnozom PB. Primenom metode direktnog sekvenciranja vršena je analiza egzona 8, 9, 10 i 11, kao i egzon/intron granica. Kod subjekata kod kojih je identifikovano prisustvo mutacije D409H vršeno je direktno sekvenciranje egzona 7 u cilju detekcije promene H255Q. U okviru analiziranih bolesnika, subgroupu od četiri bolesnika su činili oboleli od Gošeeve bolesti koji su ispoljavali i simptome PB. U analiziranoj grupi bolesnika odnos polova je bio 302:179 (muškarci:žene). Kod 10 bolesnika nisu bile poznate tačne godine početka bolesti, dok je kod preostalih 471 bolesnika raspon godina početka bio od 17 do 79 godina. Prosečne godine početka bolesti su bile 52,9 ( $\pm 11,7$ ).

Pojava prvih simptoma na desnoj strani je registrovana kod 235 bolesnika (52,9%), na levoj kod 184 (41,4%). Obostranu pojavu simptoma je imalo 25 bolesnika (5,6%), dok za 37 bolesnika ovaj podatak nije bio dostupan. Prvi simptomi su češće zahvatali gornje ekstremitete (328/438 bolesnika; 74,9%), dok su kod 62 (14,2%) bolesnika bili istovremeno zahvaćeni i gornji i donji ekstremiteti, a kod 48 (10,9%) samo donji. Tip i učestalost prvih simptoma su predstavljeni u Tabeli 26.

U cilju identifikacije asimptomatskih nosilaca mutacija u *GBA* genu, formirana je grupa srodnika obolelih od Gošeove bolesti. U okviru ove grupe je analizirano 15 ispitanika, najčešće roditelja bolesnika sa GB. Ispitanici nisu pokazivali znakove PB u trenutku uzimanja uzoraka za analizu, a prosečne godine starosti su bile 53,4 ( $\pm 4$ ), u rasponu od 36 do 70 godina.

Radi utvrđivanja učestalosti mutacija u *GBA* genu u populaciji Srbije, testirano je i 348 kontrolnih subjekata. Odnos polova u ovoj grupi je bio 105:243 (muškarci:žene), a godine u trenutku pregleda i uzorkovanja 21,3 ( $\pm 6,9$ ) sa rasponom od 19 do 77 godina.

Tabela 26. Zastupljenost i distribucija inicijalnih simptoma kod bolesnika testiranih na prisustvo mutacija u *GBA* genu.

Jedan inicijalni simptom	Broj bolesnika	Dva ili više inicijalnih simptoma	Broj bolesnika
tremor	208	rigiditet i bradikinezija	1
bradikinezija	123	rigiditet i tremor	3
rigiditet	63	bradikinezija i tremor	1
bol	19	bradikinezija i bol	1
problemi u pisanju	6	tremor i problemi sa hodom	0
problemi sa hodom	12	rigiditet, bradikinezija i tremor	1

#### 4.4.2. Distribucija promena u sekvenci *GBA* gena

U analiziranim kodirajućim regionima *GBA* gena detektovane su sledeće promene pojedinačnog nukleotida: R329H (c.1103G>A), T369M (c.1223C>T), N370S (c.1226A>G), D380V (c.1256A>T), P391L (c.1289C>T), N392S (c.1292A>G), D409H (c.1342G>C), L444P (c.1448T>C), R463C (c.1504C>T) i R463H (c.1505G>A). Pored ovih promena, detektovana su i tri kompleksna rekombinantna alela: Rec $\Delta 5$  (c.1263–1317del55), [D409H;H255Q] (c.1342G>C, c.882T>G) i RecNcil (L444P+A456P+V460V; c.1448T>C, c.1483G>C, c.1497G>C). Broj detektovanih promena, kao i njihove pozicije, su navedene u Tabeli 27.

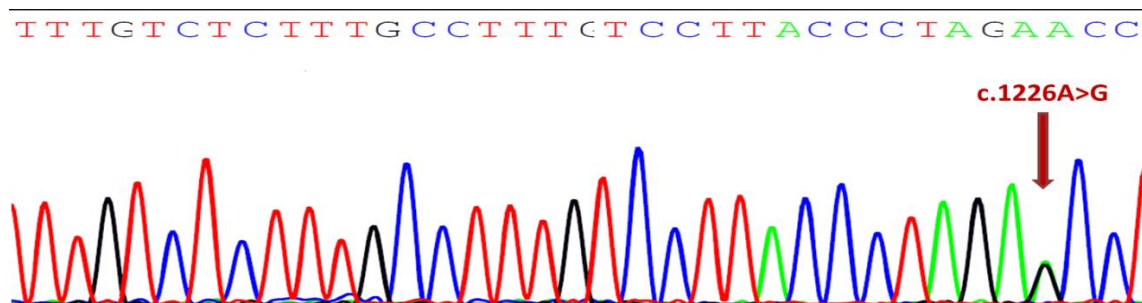
Tabela 27. Detektovane promene u kodirajućim regionima *GBA* gena.

Naziv alela <sup>1</sup>	Promena u c.DNK	Egzon	Aminokiselinska promena	Broj bolesnika	Broj srodnika	Broj kontrola
<b>Heterozigotne promene</b>						
<b>R329H</b>	c.1103G>A	8	p.Arg368His	1	0	0
<b>T369M</b>	c.1223C>T	8	p. Thr408Met	23 <sup>2</sup>	0	13
<b>N370S</b>	c.1226A>G	9	p.Asn409Ser	10	8	0
<b>D380V</b>	c.1256A>T	9	p.Asp419Val	1	0	0
<b>RecΔ5</b>	c.1263–1317del55	9		1	1	0
<b>P391L</b>	c.1289C>T	9	p.Pro430Leu	1	0	0
<b>N392S</b>	c.1292A>G	9	p.Asn431Ser	1	0	0
<b>[D409H;H255Q]<sup>3</sup></b>	c.1342G>C c.882T>G	9	p.Asp448His p.His294Gln	9	3	2
<b>RecNciI [L444P; A456P; V460V]<sup>3</sup></b>	c.1448T>C c.1483G>C c.1497G>C	10	p.Leu483Pro p.Ala495Pro p.Val499Val	4	0	0
<b>L444P</b>	c.1448T>C	10	p.Leu483Pro	2	0	1
<b>A456P</b>	c.1483G>C	10	p.Ala495Pro	0	0	1
<b>V460V</b>	c.1497G>C	10	p.Val499Val	2	0	0
<b>R463C</b>	c.1504C>T	10	p.Arg502Cys	1	0	0
<b>R463H</b>	c.1505G>A	10	p.Arg502His	2	0	0
<b>Homozigotne ili složene heterozigotne promene</b>						
<b>N370S/ N370S</b>	c.1226A>G/ c.1226A>G	9	p.Asn409Ser/ p.Asn409Ser	1	0	0
<b>N370S/ [D409H;H255Q]</b>	c.1226A>G/ c.1342G>C	9	p.Asn409Ser/ p.Asp448His	3	0	0

<sup>1</sup> – naziv alela prema ustaljenoj *GBA* nomenklaturi; <sup>2</sup> – jedan homozigotni nosilac promene; <sup>3</sup> – višestruko mutirani alel.

Ukupno je detektovano 58 heterozigotnih promena kod bolesnika sa PB, 3 složenih heterozigotnih i 1 homozigotna promena kod bolesnika sa PB i GB, 12 heterozigotnih promena kod srodnika bolesnika sa GB i 17 heterozigotnih promena u grupi kontrola.

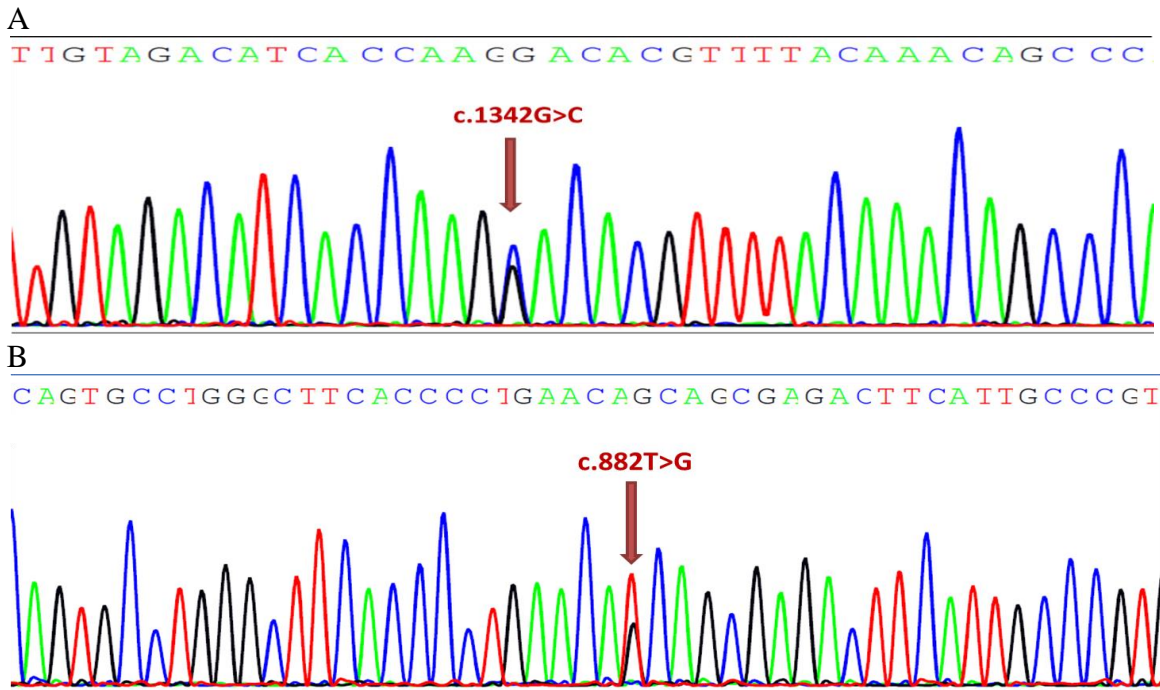
Najveći broj ispitanika su bili nosioci mutacije N370S, locirane u devetom egzonu, prikazane na Slici 29. Ova promena je detektovana u heterozigotnom obliku kod 10 bolesnika sa PB, kao i kod svih bolesnika sa GB i PB. Jedan bolesnik sa GB i PB je bio homozigotni nosilac ove mutacije, dok su 3 bolesnika bili heterozigoti za ovu mutaciju i mutaciju D409H. Kod asimptomatskih nosilaca *GBA* mutacija, N370S je bila prisutna u heterozigotnom obliku kod 8 od ukupno 15 testiranih, dok u kontrolnoj grupi nije detektovana.



Slika 29. Elektroferogram koji prikazuje promenu N370S u egzonu 9 *GBA* gena

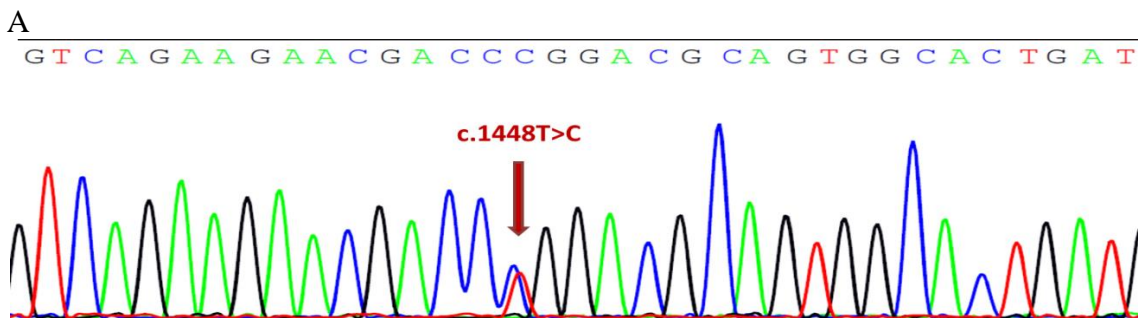
Druga najzastupljenija mutacija u analiziranim egzonima *GBA* gena je D409H koja je takođe locirana u egzonu 9 (Slika 30.A). Detektovana je u heterozigotnom obliku kod devet bolesnika sa PB, kao i kod 3 bolesnika sa GB i PB, zajedno sa gore navedenom N370S promenom. D409H je otkrivena i kod 2 asimptomatska nosioca, kao i kod 2 kontrole. Svi nosioci ove mutacije su testirani na prisustvo promene H255Q u egzonu sedam (Slika 30.B).

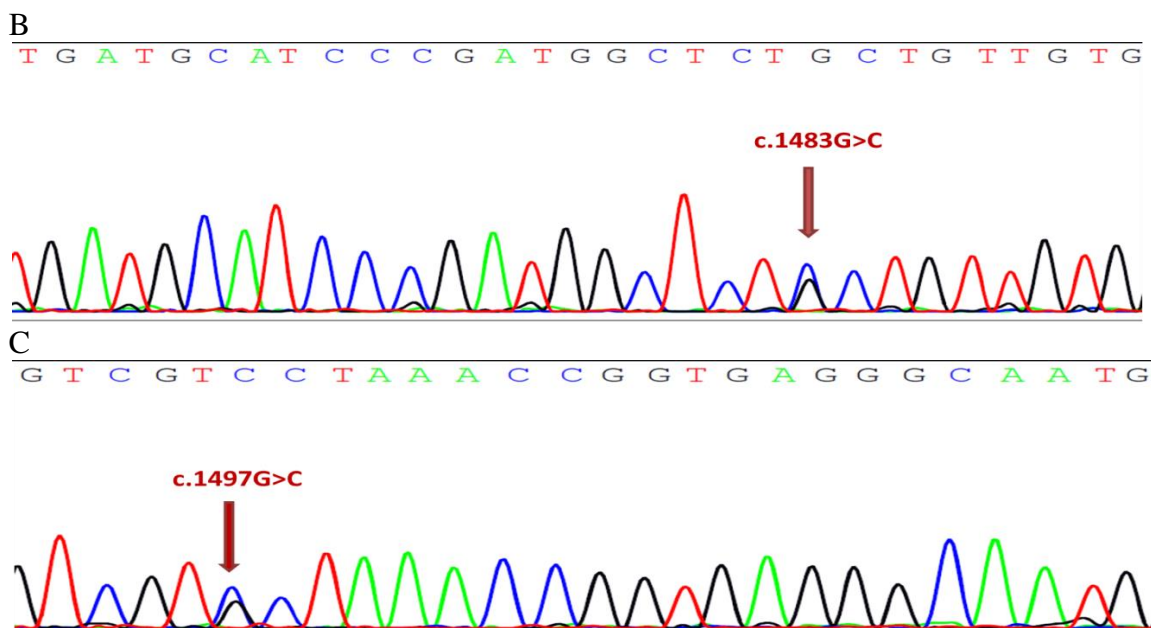




Slika 30. Elektroferogrami koji prikazuju sledeće promene: A – D409H u egzonu 9 *GBA* gena; B – H255Q u egzonu 7 *GBA* gena.

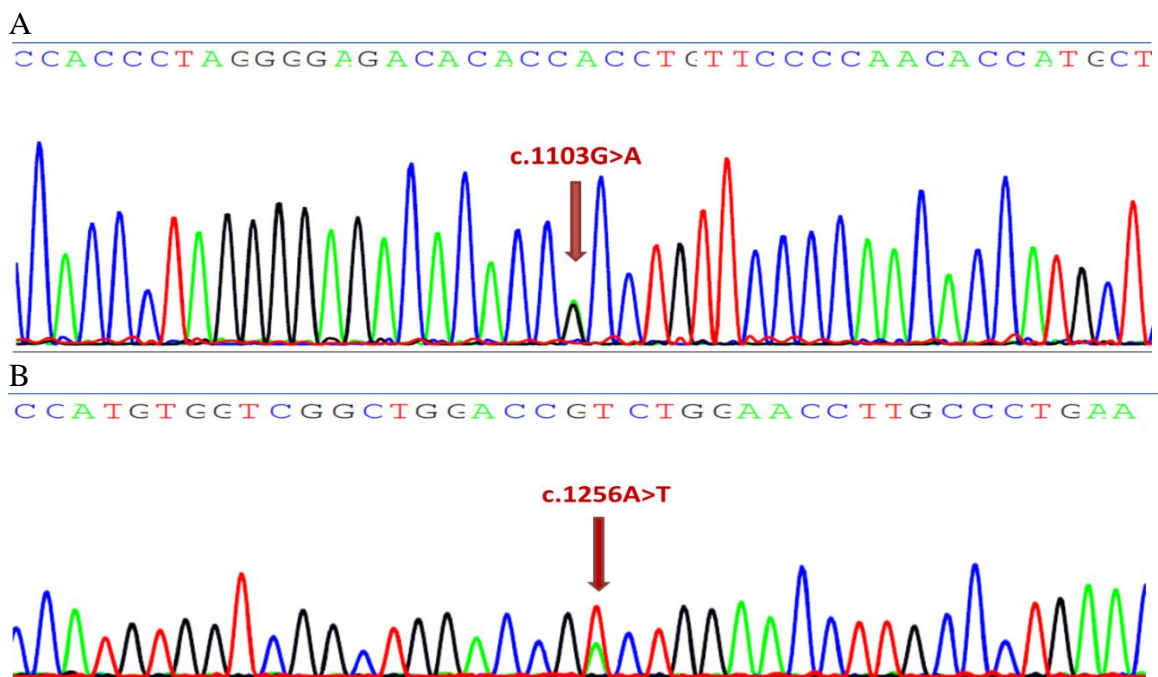
Kompleksni rekombinantni alel *RecNciI* je detektovan kod 4 bolesnika sa PB, ali nije detektovan ni kod asimptomatskih srodnika bolesnika sa GB, kao ni kod zdravih kontrola. Ovaj alel se sastoji od 3 promene: L444P, A456P i V460V, koje su locirane u desetom egzonu (Slika 31.). Mutacija L444P je nađena kod još 2 bolesnika sa PB, i kod jedne kontrole. Promena A456P je detektovana kod jedne kontrole, dok je sinonimna promena V460V detektovana kod 2 nesrodna bolesnika.





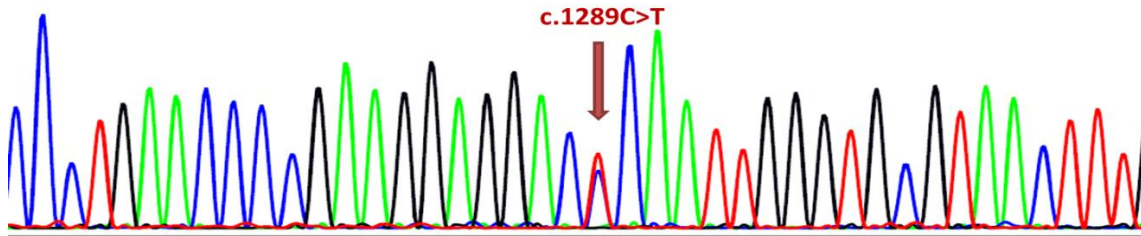
Slika 31. Elektroferogrami koji prikazuju supstitucije koje čine RecNcil rekombinantni alel: A – promena L444P; B – promena A456P; C – promena V460V.

Mutacija R463H je detektovana kod 2 bolesnika, dok je rekombinantni alel sa deletiranih 55 baznih parova detektovan kod jednog bolesnika i jednog asimptomatskog nosioca koji nisu u srodstvu. Ostale mutacije su detektovane kod pojedinačnih bolesnika (Slika 32.).



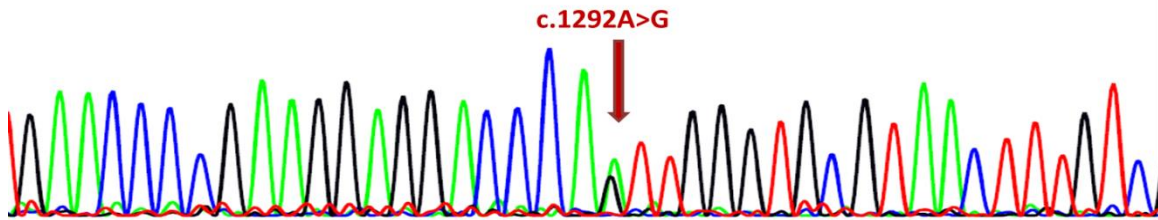
C

CCCTGAACCC CGAAGGAGGACCC AAT TGGGTG CGTAACTTT



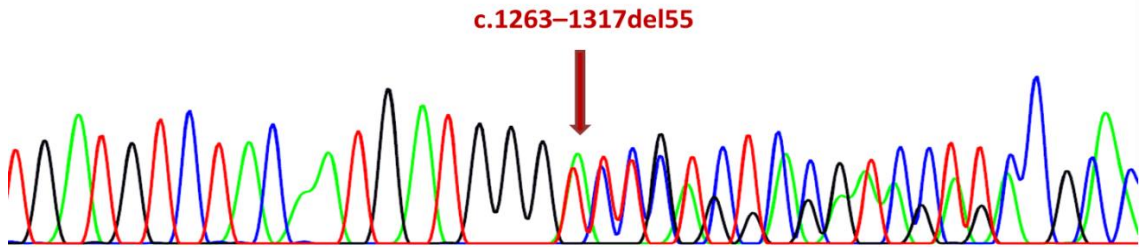
D

TGAACCCCG AAGGAGGACCC AAT TGGGTG CGTAACTTT TIGTCT



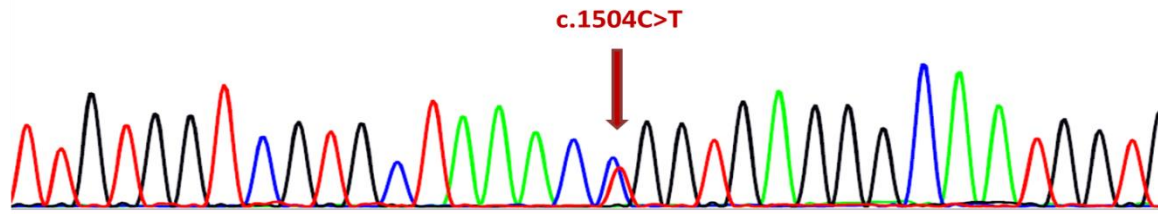
E

TGATGCTACAATG ATGGNNNTCTCCGTCCTTCCGCAC



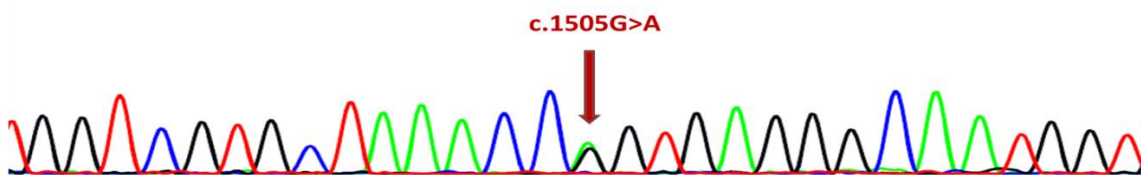
F

T T G T G G T C G T G C T A A A C C G G T G A G G G C A A T G G T



G

T G G T C G T G C T A A A C C A G T G A G G G C A A T G G T



Slika 32. Elektroferogrami koji prikazuju promene u kodirajućim regionima *GBA* gena: A – promena R329H u egzonu 8; B, C, D – promene D380V, P391L i N392S u egzonu 9; E – delecija *RecA5* u egzonu 9; F, G – promene R463C i R463H u egzonu 10.

Dve promene koje su opisane jedino u heterozigotnom obliku kod bolesnika sa PB poreklom iz Srbije su D380V i N392S. Za ove dve promene je sprovedena *in silico* analiza čiji su rezultati prikazani u Tabeli 28.

Tabela 28. Rezultati softverske predikcije za nove variante detektovane u kodirajućim sekvencama *GBA* gena

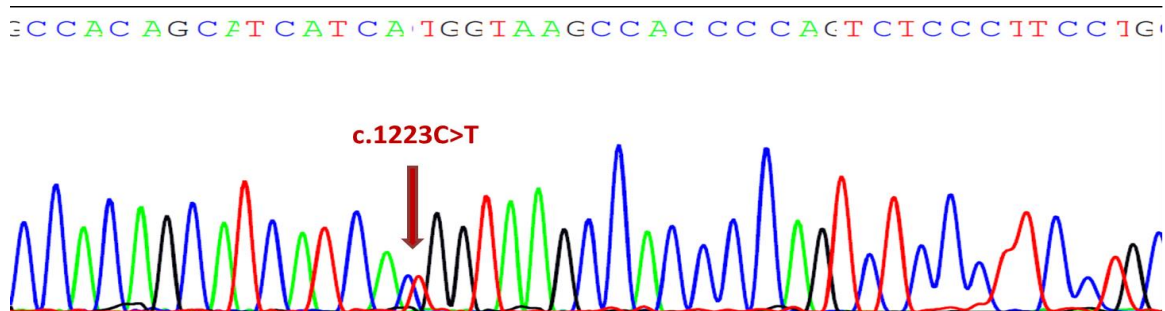
programi za predikciju	D380V p.Asp419Val	N392S p.Asn431Ser
<b>MutationTaster</b>	patogena (pouzdanost 99,99%)	patogena (pouzdanost 99,99%)
<b>PolyPhen-2</b>	verovatno štetno (1,00 <sup>1</sup> )	verovatno štetno (0,962 <sup>1</sup> )
<b>PROVEAN</b>	patogeno (-8,54 <sup>2</sup> )	patogeno (-3,75 <sup>2</sup> )
<b>SNPs&amp;GO</b>	patogeno (RI 7 <sup>3</sup> )	neutralno (RI 0 <sup>3</sup> )
<b>SIFT</b>	štetno (0,00 <sup>4</sup> )	podnošljivo (0,103 <sup>4</sup> )
<b>MutPred</b>	verovatnoća patogenosti 0,916 moguća hipoteza – nema	verovatnoća patogenosti 0,722 moguća hipoteza – nema

<sup>1</sup>verovatnoća štetnosti promene; <sup>2</sup>vrednosti manje od -2,5 se smatraju patogenim; <sup>3</sup>RI-indeks pouzdanosti (eng. *reliability index*, od 0 – nepouzdan do 10 – pouzdan);

<sup>4</sup>vrednosti manje od 0,05 se smatraju patogenim



Promena T369M u egzonu osam, na poziciji c.1223C>T, je detektovana u heterozigotnom obliku kod 22 bolesnika, dok je kod jednog bolesnika supstitucija izvršena na oba alela. U kontrolnoj grupi, ovaj polimorfizam je detektovan kod 13 ispitanika (Slika 33.).



Slika 33. Elektroferogram koji prikazuje supstituciju T369M u egzonu 8.

#### 4.4.3. Fenotipske karakteristike nosilaca *GBA* mutacija

Ukupno je opisano 37 bolesnika koji bili nosioci mutacija u analiziranim regionima *GBA* gena (33 heterozigotnih i 4 homozigotnih ili složenih heterozigotnih). U ovu grupu nisu uračunati nosioci poznatih polimorfizama T369M i A456P, kao ni nosioci sinonimne promene V460V.

Među nosiocima mutacije u *GBA* genu je bilo 20 (54,1%) bolesnika muškog i 17 (45,9%) ženskog pola. Statističkom analizom, primenom Hi kvadrat testa, nije pokazana razlika u zastupljenosti polova u odnosu na bolesnike bez mutacija ( $p=0,260$ ). Srednje godine početka bolesti su bile 53,7 ( $\pm 10,9$ ), u rasponu od 37 do 70 godina, i nisu se statistički značajno razlikovale u odnosu na testirane bolesnike bez mutacija ( $p=0,504$ ). Prva zahvaćena strana je bila desna kod 16, leva kod 13, obe kod 3, dok za 5 bolesnika podaci nisu bili dostupni. Gornji ekstremiteti su bili prvo zahvaćeni kod 22, a donji kod 3 bolesnika, dok je istovremenu pojavu simptoma i na ruci i na nozi prijavljivalo 7 bolesnika.

Najzastupljeniji prvi simptom je bio tremor, koji se javljao kod 13 bolesnika. Bradikinezija je bila zastupljena kao inicijalni simptom kod 9 bolesnika, ukočenost kod 6, bol kod četiri, a problemi u hodu kod jednog bolesnika. Bol je jedini simptom za koji je, primenom Fisherovog testa egzaktne verovatnoće, pokazana statistički značajno veća učestalost kod pacijenata sa mutacijama u *GBA* genu ( $p=0,045$ ). Ovi rezultati su potvrđeni i logističkom regresionom analizom (OR 3,620; CI 1,132-11,583).

## **5.     *Diskusija***

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. Analiza sekvence *LRRK2* gena

U ovoj studiji je primenjen selektivni pristup u analizi *LRRK2* gena koji je obuhvatio 7 egzona ovog velikog gena. Ovakav pristup je opravdan činjenicom da su patogene mutacije locirane upravo u analiziranim regionima, koji kodiraju funkcionalne domene *LRRK2* proteina (Paisán-Ruiz i sar., 2008).

Učestalost mutacija u odabranim regionima *LRRK2* gena u ovoj studiji iznosi 1,21% (6/496), što odgovara učestalosti koja je dobijena u drugim studijama u evropskim populacijama (Healy i sar., 2008).

#### 5.1.1. Distribucija promena u kodirajućim regionima *LRRK2* gena

Najrasprostranjenija dokazana patogena mutacija c.6055G>A u 41 egzonu *LRRK2* gena na proteinskom nivou dovodi do zamene glicina na poziciji 2019 serinom i u našoj studiji je detektovana kod jednog bolesnika. Multicentrične internacionalne studije su pokazale da je učestalost ove mutacije kod bolesnika sa PB 0,58% (Correia Guedes i sar., 2010). Ako se izuzmu populacije Aškenazi Jevreja i severnoafričkih Arapa gde učestalost ide i do 40%, ova mutacija je česta i u južnoevropskim populacijama, naročito u Španiji, Portugalu i Italiji (Bras i sar., 2005; Gaig i sar., 2006; Marongiu i sar., 2006; Di Fonzo i sar., 2006a; Infante i sar., 2006; Civitelli i sar., 2007; Ferreira i sar., 2007; Gonzalez-Fernandez i sar., 2007), dok je u Aziji (Lu i sar., 2005; Fung i sar., 2006; Punia i sar., 2006; Cho i sar., 2009; Zabetian i sar., 2009), Južnoj Africi (Okubadejo i sar., 2008) i severnoj



Evropi (Bialecka i sar., 2005; Schlitter i sar., 2006; Moller i sar., 2008; Pchelina i sar., 2008; Nuytemans i sar., 2009) veoma retka.

Učestalost ove mutacije kod bolesnika sa PB u našoj studiji iznosila 0,2% (1 od 496 bolesnika). Ovakvi rezultati potvrđuju da učestalost promene p.Gly2019Ser zavisi od etničke pripadnosti i da je manje zastupljena kao uzrok PB kod bolesnika srpskog etničkog porekla. Studije su pokazale da se p.Gly2019Ser mutacija nalazi na istom haplotipu u svim severno-afričkim i srednjeevropskim populacijama i da datira iz perioda pre 4 milenijuma (Lesage i sar., 2004). To otvara pitanje da li je širenje ove mutacije vremenski i prostorno rezultat isključivo genetičkog drifta ili ima uticaja i dejstvo drugih evolucionih sila. Uzimajući u obzir da simptomi PB u većini slučajeva nastaju posle reproduktivnog perioda, kao i da je prosečan životni vek bio kraći od godina početka PB, može se pretpostaviti da je ova mutacija pružala nosiocima određene prednosti u ranijim godinama života. Jedno od mogućih objašnjenja je da je mutacija na neki način povećavala otpornost prema određenim patogenima. Ova teorija je podržana i skorašnjim otkrićem uloge LRRK2 proteina u imunom sistemu (Gardet i sar. 2010). Naime, studije asocijacije čitavog genoma su pokazale da su česte varijante u *LRRK2* genu modulatori rizika za nastanak lepre i zapaljenskih bolesti creva (Zhang i sar., 2009). LRRK2 protein svoju ulogu najverovatnije ostvaruje učešćem u fagocitozi u ćelijama imunog sistema, procesu koji ima analogije sa neuronalnom endocitozom. Oba ova procesa uključuju remodeliranje ćelijske membrane i membranski transport (Gardet i sar. 2010).

Druga već opisana mutacija c.4111A>G u egzonu 29 dovodi do zamene izoleucina valinom na poziciji 1371 i u našoj studiji je takođe detektovana kod jednog bolesnika. Ova mutacija je u ranijim studijama opisana kod familijarne PB, prvo u porodici iz istočne Indije (Paisan-Ruiz i sar., 2005), a zatim i u italijanskoj porodici (Di Fonzo i sar., 2006). Segregacija mutacije sa bolešću nije mogla biti utvrđena u prvoj porodici, dok je u drugoj studiji pokazana, ali je bila ograničena malim brojem ispitivanih članova porodice. Pored toga, u prvoj studiji nije ispitivano prisustvo mutacije kod etnički odgovarajućih kontrolnih subjekata, dok je u drugoj studiji mutacija detektovana kod samo jedne zdrave kontrole od 208 ispitivanih. U kasnijoj studiji koja je obuhvatila 226 familijarnih slučajeva evropskog i

severno-afričkog porekla (Lesage i sar., 2009), ova promena je detektovana kod dva nesrodna bolesnika. Prema podacima iz ExAC baze podataka, učestalost mutacije u opštoj populaciji je 0.001043, pri čemu je najveća učestalost mutiranog alela zabeležena u evropskim i južnoazijskim populacijama (URL: <http://exac.broadinstitute.org>). Ni softveriska predikcija uticaja ove mutacije na stabilnost i funkciju proteina ne daje konzistentne rezultate. Prema softverima MutationTaster i PolyPhen-2, okarakterisana je kao verovatno patogena, dok je prema softveru SIFT podnošljiva (eng. *tolerated*). Ova mutacija dovodi do zamene jedne alifatične aminokiseline drugom, takođe alifatičnom aminokiselinom. Pozicija pogođene aminokiseline u funkcionalnom ROC domenu je visoko konzervirana kod LRRK2 homolognih proteina (Di Fonzo i sar., 2006). Neuropatološka analiza bolesnika sa ovom mutacijom je pokazala klasičnu patologiju sa Lewijevim telima (Giordana i sar., 2006), ali značaj ove mutacije u razvoju PB je i dalje nepotvrđen.

Pored ovih već opisanih mutacija detektovane su i dve promene koje do sada nisu opisane u literaturi, svaka kod pojedinačnog bolesnika. Promena c.4522A>G u egzonu 31 dovodi do zamene serina na poziciji 1508 glicinom (p.Ser1508Gly) i pogađa jedan od najkonzerviranijih funkcionalnih domena LRRK2 proteina, ROC domen, koji ima ulogu regulaciji kinazne aktivnosti proteina. *In silico* analiza pomoću MutationTaster softvera predvidela je da je p.Ser1508Gly promena patogena sa pouzdanošću od 75,9%, dok je su softveri PolyPhen-2 i MutPred opisali promenu kao patogenu sa verovatnoćom većom od 97,9%, odnosno 66,2%. Prema predikciji SIFT programom ova promena je takođe štetna, dok su dva predikciona softvera predvidela da nema uticaja na protein (PROVEAN i SNPs&GO). Interesantno je da je softver SNPs&GO i najučestaliju mutaciju LRRK2 genu, G20119S, predvideo kao neutralnu. U prilog patogenosti ove promene govore i činjenica da je polarna, neutralna aminokiselina (serin) je zamenjena nepoolarnom, alifatičnom aminokiselinom (glicin). Iako na ovoj poziciji u genomu, prema literaturi, nije opisana supstitucija, u ExAC bazi podataka postoji zabeležena zamena serina na 1508 argininom (c.4524 C>G) (URL: <http://exac.broadinstitute.org>). Ova promena je u navedenoj bazi detektovana samo u jednom uzorku afričkog porekla (1 od 120506 alela), a opisana je i u

turskoj populaciji, kod bolesnika sa PB (Pirkevi, doktorska disertacija 2009 neobjavljeni rezultati).

Druga promena koja do sada nije opisana u literaturi je c.5971A>G koja dovodi do zamene konzervirane alifatične aminokiseline (izoleucin) na poziciji 1991 u kinaznom domenu, takođe alifatičnom aminokiselinom valinom (p.Ile1991Val). Uprkos tome, nekoliko softverskih predikcija opisuje ovu promenu kao patogenu sa veoma visokom puzdanošću ili verovatnoćom (MutationTaster – pouzdanost 99,99%; PolyPhen-2 – verovatnoća 84,6%; MutPred – verovatnoća 62,9%). Prema mogućoj hipotezi MutPred softvera, svojstvo proteina koje je značajno pogodjeno ovom mutacijom je njegova stabilnost.

Nijedna od detektovanih promena kodirajuće sekvence koje do sada nisu opisane u literaturi nije pronađena kod 286 kontrolnih hromozoma, što govori u prilog njihovoj patogenosti, ali su neophodne dalje funkcionalne i segregacione analize kako bi se moguća patogenost potvrdila.

### **5.1.2. Distribucija promena u nekodirajućim regionima *LRRK2* gena**

Osim promena u kodirajućim regionima *LRRK2* gena, i u nekodirajućim regionima je detektovano 5 nukleotidnih promena. Četiri promene su opisane u literaturi kao benigni intronski polimorfizmi i u ExAC bazi podataka opšte učestalosti su sledeće: c.5510-9A>G: 0,002827 (broj alela 333/117808), c.5656+35G>AČ: 0,66 (broj alela 7522/113964), c.5948+34T>C: 0,0065 (broj alela 755/116158) i c.5948+48C>T: 0,1257 (broj alela 14121/112352) (URL: <http://exac.broadinstitute.org>). Učestalosti intronskih polimorfizama u našoj studiji nisu značajno odstupale od učestalosti u ExAC bazi.

Supstitucija u intronu 31 na poziciji +3 (c.4536+3A>G) je prvi put opisana kod jednog bolesnika sa sporadičnom PB i nije potvrđena njena uloga u nastanku bolesti (Zabetian i sar., 2005). U studiji kod iranskih bolesnika sa PB ova promena je opisana kod

jednog bolesnika sa familijarnom formom PB, ali nije opisana kod sestre bolesnika koja je imala simptome bolesti, dok je opisana kod druge dve sestre bolesnika koje nisu bile aficirane u trenutku pregleda (u 41. i 54. godini života) (Shojaee i sar., 2009). U našoj studiji promena je nađena kod 2 nesrodna bolesnika sa PB, ali i kod tri kontrolna subjekta. Prosečna starost kontrolnih subjekata u trenutku pregleda i uzorkovanja iznosila je 58,3 godine. Prema ExAC bazi (URL: <http://exac.broadinstitute.org>), opšta učestalost ove promene je 0.0002825 (34 od 120344 alela), dok je u Evropi nešto veća (0.00043839). U mnogim populacijama, osim u latinoameričkim, promena uopšte nije detektovana. Prema softverskoj predikciji, primenom Mutation Taster, NNSplice i GENSCAN programa ova mutacija utiče na mesto za iskrajanje egzona. Zamena adenina guaninom dovodi do ukidanja donorskog mesta u intronu 31 i do pomeranja mesta iskrajanja egzona za 8 nukleotida nizvodno. Na taj način dolazi do skraćanja proteina kome nedostaje 1514 aminokiselina i ovakav protein ne poseduje funkcionalne domene sa GTPaznom i kinaznom funkcijom (Shojaee i sar., 2009).

Na osnovu ovih rezultata, moguće je da ova promena predstavlja patogenu mutaciju sa smanjenom penetrantnošću, tako da se javlja i kod naizgled sporadičnih slučajeva, kao i kod asimptomatskih srodnika obolelih i kontrola. Pored toga, moguće je objašnjenje da ovako izmenjeni protein ne dobija novu, patogenu funkciju, jer mu nedostaju funkcionalni domeni, i da podleže degradaciji. To bi dovodilo do haploinsuficijencije *LRRK2* proteina što bi objasnilo detekciju promene i kod kontrola i kod asimptomatskih srodnika.

### **5.1.3. *LRRK2* gen: Korelacije genotipa sa fenotipom**

Fenotip nosilaca mutacija u *LRRK2* genu se nije mnogo razlikovao među samim nosiocima mutacija, uprkos činjenici da su mutacije pogađale različite funkcionalne domene proteina. Pored toga, nosioci mutacija su imali tipičnu kliničku sliku PB koja je uključivala asimetričan početak bolesti i, u nekim slučajevima, sporu progresiju bolesti. Ovakvi nalazi su u saglasnosti sa podacima iz literature, gde do sada nije pokazano

postojanje konzistentne korelacije između genotipa i fenotipa kod bolesnika sa *LRRK2* mutacijama (Healy i sar., 2008).

Godine pojave prvih simptoma kod zahvaćenih bolesnika opisanih u ovoj studiji sa *LRRK2* mutacijom u kodirajućem regionu su bile između 41. i 66. godine, sa srednjom vrednošću od 55 godina ( $\pm 10,1$ ). Ako se uključe i bolesnici sa promenom u intronu 31 (c.4536+3A>G), za koju je softverski dobijena predikcija da je patogena, prosečne godine početka se značajno ne menjaju i iznose 55,2 ( $\pm 9,9$ ). Pet bolesnika je imalo pojavu prvih simptoma posle 55. godine života, što je u skladu sa podacima iz literature prema kojima se *LRRK2*-PB klinički ne može razlikovati od idiopatske PB.

Kod jednog bolesnika koji je nosilac nove promene Ile1991Val u *LRRK2* genu, prvi simptomi su nastali u 41. godini života što je u korelaciji sa studijom Hedrich i saradnika i implicira da analizu *LRRK2* gena treba uključiti i u genetičko testiranje PB ranog početka (Hedrich i sar., 2006). Pojava prvih simptoma kod našeg bolesnika je bila asimetrična, sa tremorom ruku kao predominantnim simptomom, dok je porodična anamneza bila negativna.

Druga bolesnica sa do sada neopisanom promenom, Ser1508Gly, se klinički ispoljava blagom hipomimijom, levostranom bradikinezijom i ukočenošću kao prvim simptomom i negativnom porodičnom anamnezom. Kod bolesnice je detektovana i promena u devetom egzonu *GBA* gena.

Bolesnici sa poznatim promenama u kodirajućim regionima, p.Ile1371Val i p.Gly2019Ser, su imali približno iste godine početka bolesti (57. i 56. godina). Oba bolesnika su ženskog pola i sa pozitivnom porodičnom anamnezom koja je ukazivala na autozomno-dominantno nasleđivanje bolesti. U slučaju bolesnice sa p.Ile1371Val mutacijom otac je bio oboleo od PB, dok je kod bolesnice sa p.Gly2019Ser obolela majka, ali ni u jednom slučaju srodnici nisu bili dostupni za analizu. Klinička slika naše bolesnice sa p.Gly2019Ser mutacijom je bila u korelaciji sa ranijim studijama koje su pokazale da se klinička prezentacija ne razlikuje od bolesnika sa drugim *LRRK2* mutacijama kao i od kliničke slike idiopatske PB. Srednje godine početka bolesti su oko 60 godina, sa

unilateralnim tremorom kao inicijalnim simptomom, sporom progresijom i dobrim odgovorom na levodopu (Healy i sar., 2008).

Promena u intronu 31 (c.4536+3A>G), koja prema dostupnim softverskim predikcijama rementi iskrajanje egzona, je detektovana kod dva nesrodna bolesnika. Oba bolesnika su ženskog pola, sa asimetričnim početkom bolesti i negativnom porodičnom anamnezom. Godine početka bolesti su bile različite (49 i 62), kao i prvi zahvaćeni region tela. Bolesnica sa ranijim početkom bolesti je kao inicijalni simptom navodila probleme u pisanju, dok je kod druge bolesnice kao prvi simptom zabeležena rigiditet.

U analiziranoj grupi bolesnika bilo približno 1,6 puta više bolesnika muškog pola. Ovakav odnos polova kod bolesnika sa PB je u saglasnosti sa podacima iz literature, gde se navodi da je odnos polova 1,5:1 (muški:ženski pol) (Wooten i sar., 2004; Taylor i sar., 2007). Još uvek nije poznato šta predstavlja osnovu ovih razlika, ali se pretpostavlja da su muškarci u radnom okruženju više izloženi toksinima koji povećavaju rizik za nastanak PB. Sa druge strane, ističe se i potencijalna neuroprotektivna uloga endogenog estrogena i progesterona kojima su žene izložene tokom ranijeg životnog perioda (Saunders-Pullman, 2003; Gillies i McArthur, 2010). Imajući u vidu autozomno-dominantno nasleđivanje mutacija u *LRRK2* genu, očekivano bi bilo da se ovakav odnos polova zadrži i među nosiocima mutacija. Suprotno tome, učestalost žena među nosiocima mutacija u *LRRK2* genu je iznosila 83,3% (5 od 6 nosilaca). Relativno visoka učestalost ženskog pola među nosiocima mutacija u *LRRK2* genu u odnosu na bolesnike sa sporadičnom PB je opisana u nekoliko studija u populaciji Aškenazi Jevreja (Orr-Urtreger i sar., 2007; Saunders-Pullman i sar., 2011), kao i u nedavnoj studiji u italijanskoj populaciji (Cilia i sar., 2014). Ovakav trend je primećen i u drugim studijama genetičke osnove PB, ali zbog malog broja bolesnika, ove razlike nisu dostigle statističku značajnost (Marras i sar., 2011). Potencijalno objašnjenje ovakvih nalaza leži u smanjenoj penetrantnosti *LRRK2* mutacija (Healy i sar., 2008), tako da se može pretpostaviti da je za razvoj simptoma bolesti potrebno prisustvo još nekog genetičkog faktora ili faktora spoljašnje sredine. Jedna od postavljenih hipoteza je da mutirani *LRRK2* protein intereaguje sa ženskim hormonima ili nekim nepoznatim genetičkim faktorima, što bi objasnilo prisustvo više od 50% ženskih nosilaca mutacije kod

kojih je došlo do razvoja simptoma PB. U tom slučaju bi trebalo da postoji razlika u godinama početka i težini i progresiji bolesti kod nosilaca mutacija ženskog pola u odnosu na nosioce mutacija muškog pola. Takođe bi bilo očekivano da ova razlika postoji i među ženama obolelim od PB, sa i bez mutacija u *LRRK2* genu. U našoj studiji ovakva pravilnost nije utvrđena. Najranije godine početka je imao upravo jedini bolesnik muškog pola, a prosečna starost na početku bolesti kod žena nosilaca mutacije je iznosila 58 godina, dok je kod žena bez mutacija bila 53,6 godina. Ovakvi nalazi su u skladu sa nalazima nedavne studije u italijanskoj populaciji (Cilia i sar., 2014).

#### **5.1.4. Preporuke za dijagnostičko genetičko testiranje *LRRK2* gena**

Imajući u vidu učestalost mutacija u *LRRK2* genu kod bolesnika sa PB u našoj populaciji, analiza ciljanih regiona *LRRK2* gena bi trebalo da bude deo dijagnostičkog postupka kod bolesnika sa tipičnom kliničkom slikom PB.

Prvi korak u genetičkom testiranju *LRRK2* gena bi obuhvatao kodirajuće regione koji kodiraju funkcionalne domene *LRRK2* proteina. Od 7 poznatih mutacija sa potvrđenom patogenošću, u ovoj studiji je detektovana samo jedna, tako da bi ograničavanje u testiranju samo na ove promene moglo biti previše restriktivno.

U testiranje bi trebalo uključiti bolesnike sa tipičnom PB kasnog početka i sa pozitivnom porodičnom anamnezom koja ukazuje na autozomno-dominantno nasleđivanje. Iz testiranja ne treba isključivati ni bolesnike kod kojih porodična anmneza ne ukazuje jasno na ovakav tip nasleđivanja, jer pojedine mutacije u ovom genu, kao što je Gly2019Ser pokazuju smanjenu penetrabilnost, što u nekoj meri objašnjava zašto se ova mutacija nalazi relativno često i u naizgled sporadičnim slučajevima PB.

Rezultati ove studije ukazuju da se mutacije u *LRRK2* genu mogu javiti i kod bolesnika sa ranim početkom bolesti, tako da bi starosna granica za uključivanje bolesnika u testiranje mogla biti pomerena na  $\geq 40$  godina u trenutku pojave prvih simptoma.

Posebno bi trebalo obratiti pažnju na testiranje bolesnika ženskog pola sa pozitivnom porodičnom anamnezom, jer rezultati ukazuju na veću učestalost žena među nosiocima mutacija, uprkos većoj učestalosti muškaraca među bolesnicima sa PB.

## 5.2. Analiza sekvence *VPS35* gena

*VPS35* gen je jedan od najskorije otkrivenih gena za koje je pokazano da dovode do autozomno-dominantne PB, označene kao PARK17. Segregacija mutacije u ovom genu sa bolešću je utvrđena u nekoliko porodica evropskog porekla (Vilarino-Guel i sar., 2011; Zimprich i sar., 2011), ukazujući da *VPS35* može da bude uzrok familijarne PB u evropskim populacijama. Utvrđivanje učestalosti ove mutacije u različitim populacijama i etničkim grupama širom sveta kako kod bolesnika sa PB tako i kod kontrola je neophodno da bi se utvrdio koliki doprinos ova mutacija ima u patogenezi PB.

Radi utvrđivanja učestalosti jedine potvrđene mutacije u *VPS35* genu, u našoj studiji je primenjen selektivni pristup analize ovog gena. Vršeno je direktno sekvenciranje egzona 15, u kome je locirana navedena promena. U cilju maksimizacije šansi za detekciju mutacije, u analizu su uključeni svi dostupni bolesnici sa dijagnozom PB, bez obzira na godine početka bolesti, porodičnu anamnezu ili kliničku prezentaciju bolesti. Kako je pokazano da mutacija p.Asp620Asn ima nekompletnu penetrantnost (Zimprich i sar., 2011), moglo se očekivati da se ova mutacija može naći i kod bolesnika sa naizgled sporadičnom PB.

Uprkos svemu navedenom, mutacija c.1858G>A nije detektovana ni kod jednog testiranog bolesnika (0/496) ukazujući da *PARK17* nije čest oblik PB ni kod familijarnih, ni kod sporadičnih slučajeva bolesti u Srbiji. Od otkrića mutacije u *VPS35* genu, sproveden je veliki broj studija, kako u evropskim, tako i u drugim populacijama i na osnovu sumiranih rezultata utvrđeno je da je opšta učestalost mutacije 0,11% (24/21,762) (Blanckenberg i sar., 2014). Na osnovu date učestalosti i broja bolesnika analiziranih u našoj studiji, odsustvo mutacije kod naših bolesnika nije iznenađujuće.



Identifikacija mutacija u *VPS35* koje učestvuju u patogenezi PB pruža snažne dokaze za učestvovanje retromera u nastanku PB kao i da je narušavanje endozomnog transporta jedan od puteva nastanka neurodegeneracije. Ova mutacija u *VPS35* predstavlja odličan model za uspostavljanje *in vitro* i *in vivo* sistema kojima bi se moglo utvrditi da li razlika u ekspresiji proteina koji se transportuju retromerom leži u osnovi selektivne osetljivosti dopaminergičkih neurona (Vilarino-Guel i sar., 2011).

Analiza *VPS35* gena, kao i drugih gena koji kodiraju proteine retromernog kompleksa, ne samo kod bolesnika sa PB, već i sa drugim poremećajima pokreta, može značajno pomoći u rasvetljavanju uloge ovog kompleksa u patogenezi.

### **5.2.1. Preporuke za dijagnostičko genetičko testiranje *VPS35* gena**

Mutacije u *VPS35* genu nisu čest uzrok PB u našoj populaciji, tako da analizu ovog gena treba uvrstiti u genetičko testiranje samo u nekoliko jasno definisanih slučajeva. Bolesnici koji bi bili kandidati za analizu *VPS35* gena, treba da imaju tipičnu PB kasnog početka, kao i pozitivnu porodičnu anamnezu koja nedvosmisleno ukazuje na autozomno-dominantno nasleđivanje, kroz više generacija. Pored toga, kod navedenih bolesnika treba analizirati *LRRK2* gen, i tek nakon dobijenih negativnih rezultata pribeći testiranju *VPS35* gena.

## **5.3. Analiza sekvence *Parkin* gena**

Mutacije u *Parkin* genu koje dovode do autozomno-recesivne PB i koje su do sada opisane u literaturi obuhvataju i promene u sekvenci svih kodirajućih regiona, kao i varijacije u broju kopija kodirajućih regiona gena, i do sada je opisano preko 100 ovakvih patogenih promena. Najčešće mutacije su delecije egzona 4, delecije egzona 3, delecije egzona 3 i 4, tačkaste mutacije u egzonu 7 i delecija jednog baznog para u egzonu 2. Ovih 5 varijanti predstavljaju oko 35% svih mutacija u *PARK2* genu. Tačkaste mutacije su

najčešće locirane u egzonima 2 i 7, dok se rearanžmani najčešće dešavaju u intronima 2, 3 i 4 (Hedrich i sar. 2004). Ipak, mutacije u *Parkin* genu su distribuirane u svim delovima gena tako da selektivni pristup analizi nije preporučljiv. Iz tog razloga je sprovedena sveobuhvatna analiza *PARK2* gena koja je uključivala direktno sekvenciranje svih kodirajućih regiona, kao i detekciju delecija i multiplikacija ovih regiona. Imajući u vidu da prisustvo dva mutirana alela *Parkin* gena uglavnom dovodi do nastanka PB ranog ili čak juvenilnog početka bolesti, jedan od kriterijuma za testiranje bolesnika na prisustvo mutacija u ovom genu su bile godine početka bolesti pre 50. godine života. Drugi kriterijum uključivanja je bila pozitivna porodična istorija PB koja ukazuje na autozomno-recesivno nasleđivanje.

### **5.3.1. Distribucija promena u sekvenci kodirajućih regiona *Parkin* gena**

Ukupan broj različitih promena detektovanih u kodirajućim regionima *PARK2* gena je 13, od čega je jedna promena sinonimna (p.Pro247Pro), dok su 3 promene (p.Ser167Asn, p.Val380Leu, p.Asp394Asn) detektovane kod većeg broja bolesnika i u bazama podataka dbSNP142 (Sherry i sar., 2001) i ExAC (URL: <http://exac.broadinstitute.org>) su opisane kao polimorfizmi. U okviru preostalih 9 promena, 2 do sada nisu opisane u literaturi, a sedam se mogu označiti kao patogene ili potencijalno patogene.

Promene u sekvenci koje do sada nisu opisane u literaturi predstavljaju supstitucije u egzonima 4 i 5 (p.Val157Met i p.Glu195Lys) i pogađaju aminokiseline koje se nalaze u L1 regionu (eng. *Linker 1*) Parkin proteina koji ima ulogu u povezivanju UBL i RING0 domena. Svaka promena je identifikovana kod pojedinačnog bolesnika kod koga nisu identifikovane druge promene u sekvenci. Većina primenjenih programa za softversku predikciju je sa velikom pouzdanošću okarakterisalo ove promene kao benigne, tako da se moglo pretpostaviti da su u pitanju izuzetno retki polimorfizmi. Jedino je promena p.Val157Met opisana kao potencijalno patogena prema PolyPhen-2 i SIFT, ali su ostale 4 predikcije ovu promenu smatrale neutralnom.

Dve promene koje pogađaju aminokiseline u UBL domenu proteina su identifikovane kod 2 bolesnika. Mutacija c.101\_102delAG dovodi do promena okvira čitanja usled delecije 2 bazna para u drugom egzonu. Kao posledica toga, stop kodon se javlja nakon 5 ugrađenih aminokiselina od mesta promene i dolazi do prerane terminacije sinteze proteina. Ova mutacija je detektovana kako kod bolesnika koji su nosioci 2 mutirana alela *Parkin* gena, tako i kod heterozigotnih nosilaca, u različitim populacijama (Abbas i sar., 1999; Hedrich i sar., 2002; Gouider-Khouja i sar., 2003; Illarioshkin i sar., 2003; Lesage i sar., 2008; Guo i sar., 2008; Pankratz i sar., 2009; Koziorowski i sar., 2010). Patogenost promene je sa jedne strane potvrđena njenom segregacijom sa bolešću, a sa druge strane prirodom same mutacije koja onemogućava sintezu *Parkin* proteina. U našoj studiji je kod nosioca ove mutacije identifikovana i promena u broju kopija egzona 3.

Druga mutacija u UBL domenu (c.167T>A) dovodi do zamene nepolarne aminokiseline valina na poziciji 56 u polarnu glutaminsku kiselinu. Ova mutacija je prema bazama podataka PDmutDB (Nuytemans i sar., 2010; Cruts i sar., 2012) i HGMD (<http://www.hgmd.org>) okarakterisana kao patogena. Prema dostupnim podacima iz literature opisana je prvi put kod familijarne PB u Španiji (Hoenicka i sar., 2002) i do sada nije opisivana u drugim populacijama. U navedenoj studiji promena je detektovana samo u jednoj porodici sa autozomno-recesivnim načinom nasleđivanja PB, i nije detektovana u 96 kontrolnih hromozoma. U našem istrživanju, bolesnik kod koga je detektovana ova promena je ujedno bio nosilac i supstitucije u egzonu 7, što može govoriti u prilog patogenosti ove izuzetno retke mutacije.

U egzonu 3 *Parkin* gena su detektovane 2 mutacije, svaka kod pojedinačnog bolesnika. Promena c.245C>A dovodi do zamene aminokiseline alanina na poziciji 82 u proteinu glutaminskom kiselinom u L1 domenu *Parkin* proteina. Ova promena je opisana u različitim populacijama, ali njena patogenost nije sa sigurnošću potvrđena prema PDmutDB (Nuytemans i sar., 2010; Cruts i sar., 2012), dok je u bazi dbSNP evidentirana kao patogena. Opšta učestalost redeg alela iznosi 0,0012 prema 1000Genomes projektu, tako da nije iznenađujuće da je ova promena detektovana u nekim studijama u

heterozigotnom obliku i kod zdravih kontrola (Pankratz i sar., 2009). Bolesnik kod koga je ova promena detektovana u našoj studiji nije bio nosilac druge mutacije u *Parkin* genu.

Druga mutacija detektovana koja pogađa L1 domen je takođe locirana u egzonu 3 (c.399\_400insCCA). Ova promena predstavlja inserciju 3 nukleotida i ne dovodi do promene okvira čitanja, već samo do umetanja još jedne aminokiseline (prolin) na poziciji 133 u proteinu. Prvi put je opisana kod heterozigotnog nosioca mutacije, ali nije dalje ispitivana patogenost promene. U istom radu promena nije detektovana ni kod jedne od 263 testirane kontrole (Pankratz i sar., 2009). Prema softverskoj predikciji primenom Mutation Taster softvera, ova promena nije patogena, dok je prema softveru PROVEAN njen uticaj štetan po protein. Prema ExAC bazi ova promena je detektovana kod samo 3 alela od 120816 analiziranih i to sva tri evropskog porekla (URL: <http://exac.broadinstitute.org>). U našoj studiji je detektovana u heterozigotnom stanju kod bolesnika koji nije bio nosilac ni jedne druge mutacije u *Parkin* genu. Interesantno je da je na istoj poziciji u proteinu (p.Pro133) u ranijoj studiji detektovana delecija, takođe kod heterozigotnog nosioca (Hedrich i sar., 2004).

Ring1 funkcionalni domen proteina je u ovom istraživanju bio pogođen sa 2 nesinonimne supstitucije locirane u sedmom egzonu *Parkin* gena. Mutacija c.758G>A dovodi do zamene cisteina tirozinom na poziciji 253 i u ovom istraživanju je detektovana kod jednog bolesnika koji je bio nosilac i već spomenute tačkaste mutacije u egzonu dva. Ova promena je opisana u literaturi kod familijarnih formi PB, kod složenih heterozigota (Sun i sar., 2006; Wang i sar., 2008), dok je u kineskoj populaciji na istoj poziciji opisana zamena cisteina fenilalaninom kod bolesnika sa dopa – responsivnom distonijom (Wu i sar., 2008).

Druga mutacija u sedmom egzonu (c.823C>T) je detektovana kod 2 nesrodna bolesnika koji nisu nosili drugu mutaciju u *Parkin* genu. Ova promena dovodi do zamene aminokiseline arginina na poziciji 275 u proteinu, triptofanom. Prema softverskoj predikciji ova mutacija se može smatrati patogenom, kao i prema bazi podataka dbSNP, dok je prema PDmutDB (Nuytemans i sar., 2010; Cruts i sar., 2012) okarakterisana kao promena sa

nejasnom patogenošću. Opšta učestalost mutiranog alela, prema 1000Genomes projektu, je 0,0004.

Još jedna mutacija detektovana u našoj studiji je locirana u egzonu 12 i dovodi do zamene prolina leucinom na poziciji 437 u Ring2 funkcionalnom domenu proteina. Ova promena je opisana u brojnim studijama kako kod bolesnika koji poseduju 2 mutirana alela (Djarmati i sar., 2004), tako i kod heterozigotnih nosilaca, ali i kod zdravih kontrola u heterozigotnom obliku (Pankratz i sar., 2009). Interesantno je da je u studiji Pankratz-a i saradnika ova promena okarakterisana kao benigna prema softverskoj predikciji, ali je detektovana i u homozigotnom obliku, kod tri nesrodna bolesnika sa kasnim početkom bolesti (Pankratz i sar., 2009). I u našoj studiji ova promena je detektovana kod jednog bolesnika sa kasnim početkom bolesti koji nije bio nosilac druge mutacije u *Parkin* genu.

### **5.3.2. Distribucija promena u broju kopija kodirajućih regiona *Parkin* gena**

Promene u broju kopija kodirajućih regiona *Parkin* gena su skoro podjednako učestale kao i promene u sekvencama ovih regiona (Nuytemans i sar., 2010). U pojedinim studijama je zastupljenost ovih promena i značajno veća u odnosu na promene u sekvenci (Elfferich i sar., 2011). U ovom istraživanju je čak 87% detektovanih mutacija predstavljalo variranja u broju kopija kodirajućih regiona.

U našem istraživanju je detektovano 8 promena broja kopija, što je približno jednako broju detektovanih tačkastih mutacija i malih insercija i delecija i ovakvi nalazi su u korelaciji sa gore navedenim podacima iz literature. Detektovane duplikacije ili delecije su češće bile prisutne kod bolesnika koji su imali dve mutacije u *Parkin* genu (kod 3 od 4 bolesnika). Od toga su kod dva bolesnika obe mutacije predstavljale upravo promene broja kopija kodirajućih regiona.

Regioni koji su najčešće deletirani ili multiplicirani su obuhvatali egzone 2 i 3, bilo pojedinačno, bilo kao jedinstven region. Pored toga, kod jednog bolesnika, multipliciran je

region od 4. do 7. i od 5. do 7. egzona. Ostali egzoni nisu bili afektirani promenama u broju kopija. Učestalost promena broja kopija kod kontrolnih subjekata je do sada analizirana u svega nekoliko studija. Najveća studija je obuhvatila 1686 kontrolnih subjekata, i ni kod jednog nije detektovano prisustvo 2 mutacije u *Parkin* genu (ni promena broja kopija, ni promene u sekvenci kodirajućih regiona). Pored toga, među kontrolnim ispitanicima su detektovani nosioci heterozigotnih delecija egzona 2, 3 i 4, i nosioci heterozigotnih multiplikacija egzona 1, 2 i 3. Promene broja kopija od 5. do 9. egzona su detektovane samo kod bolesnika, dok promene od 10 do 12 egzona nisu registrovane (Kay i sar., 2010).

### **5.3.3. Distribucija promena u sekvenci nekodirajućih regiona *Parkin* gena**

Prilikom detekcije promena u sekvenci kodirajućih regiona *Parkin* gena, obuhvaćene su i egzon/intron granice u cilju detekcije promena koje mogu uticati na promene mesta iskrajanje egzona. U analiziranom delu introna detektovano je nekoliko promena: c.171+25T>C koja se nalazi u intronu 2, c.413-20T>C koja se nalazi u intronu 3, c.934-22A>G koja se nalazi u intronu 7 i c.1285+34G>A koja je locirana u intronu 11. Sve navedene promene se nalaze u bazama podataka i predstavljaju variranja sekvence DNK koja ne dovode do promena na proteinskom nivou.

Promena c.171+25T>C je detektovana kod 78 bolesnika u heterozigotnom obliku, dok su četiri bolesnika bili homozigoti za ovu promenu. Učestalost manje zastupljenog alela je iznosila 0,19 u našoj studiji, dok je učestalost u opšta učestalost 0,27, a u evropskim populacijama 0,25, prema 1000Genomes projektu.

Supstitucija c.413-20T>C je detektovana samo u heterozigotnom obliku kod 18 bolesnika, tako da je učestalost alela c.413-20C 0,04, što je u korelaciji sa opštom učestalošću prema 1000Genomes projektu, od 0,05.

Veoma retka supstitucija, c.934-22A>G, je detektovana kod samo jednog bolesnika u heterozigotnom obliku, tako da njena učestalost iznosi 0,002. Opšta učestalost ove promene, prema 1000Genomes projektu, je znatno manja i iznosi svega 0,0008.

Četvrti detektovani intronski polimorfizam je c.1285+34G>A i opisan je kod 2 nesrodna bolesnika u heterozigotnom obliku. Učestalost od 0,004 je u skladu sa opštom učestalošću koja iznosi manje od 0,01.

### **5.3.4. *Parkin* gen: Korelacije genotipa sa fenotipom**

Od ukupnog broja testiranih bolesnika (225) identifikovano je 12 bolesnika sa mutacijama u *Parkin* genu, što iznosi 5,33%. Identifikovana su 4 bolesnika sa dva mutirana alela (1,78%), dok je broj bolesnika sa po jednim mutiranim alelom bio 8 (3,55%). Među heterozigotima tri bolesnika su bili nosioci delecija ili multiplikacija, dok je tačkaste mutacije sa potvrđenom ili mogućom patogenošću imalo 5 bolesnika.

#### **5.3.4.1. Homozigotni i složeni heterozigotni nosioci mutacija u *Parkin* genu**

Kod bolesnika koji su bili složeni heterozigoti prosečna starost na početku bolesti je bila 30,3 ( $\pm 12,7$ , raspon 18–48), što je za 13 godina ranije u odnosu na prosečnu starost na početka bolesti testiranih bolesnika bez ijedne *Parkin* mutacije (43,8 godina). Tri od četiri bolesnika su imali početak bolesti pre tridesete godine života, što podržava dokaze da su mutacije u *Parkin* genu odgovorne za nastanak autozomno-recesivne PB juvenilnog i ranog početka. Ukoliko uporedimo samo bolesnike sa početkom bolesti pre 30 godina života, učestalost složenih heterozigota se povećava na 25% (3/12).

Bolesnik kod koga su prvi simptomi počeli najkasnije (označen kao P1), u 48. godini života, je bio muškog pola i jedini je prijavljivao pozitivnu porodičnu anamnezu. Inicijalni simptom kod ovog bolesnika je bio tremor koji se javio najpre na rukama, obostrano. Bolesnik je imao 58 godina na pregledu, tako da je tokom 10 godina trajanja

bolesti razvio i distoniju. Bolesnik P1 je nosilac heterozigotne duplikacije egzona 4 i homozigotne duplikacije egzona od 5 do 7. Navedeni egzoni kodiraju regione proteina koji obuhvataju Ring1 funkcionalni domen proteina, čija je funkcija u ovom slučaju najverovatnije kompromitovana.

Bolesnik kod koga su prvi simptomi počeli najranije je označen kao P3. Ovaj bolesnik je ženskog pola i ima juvenilnu formu PB sa početkom u osamnaestoj godini života i negativnu porodičnu anamnezu. Na pregledu je bolesnica imala 48 godina, tako da je bolest trajala već 30 godina. Kod ove bolesnice su, takođe detektovane promene u broju kopija kodirajućih regiona (homozigotna delecija egzona 2 i heterozigotna delecija egzona 3).

Kod jednog bolesnika je detektovana duplikacija egzona 3 i delecija 2 nukleotida u egzonu 2. Bolesnik je muškog pola, sa početkom bolesti u 27. godini i negativnom porodičnom anamnezom. Kao prvi simptom se javio desnostrani tremor. Približne godine početka bolesti (28) imao je i bolesnik sa dve tačkaste mutacije u *Parkin* genu. Ovaj bolesnik je bio ženskog pola, sa negativnom porodičnom anamnezom i sa prvim simptomima na desnoj nozi, u vidu otežanog hoda.

Kao što je već rečeno, na osnovu kliničkih podataka bolesnika sa 2 mutacije, nije moguće utvrditi jasnu korelaciju genotipa sa fenotipom. Takođe, jedina upadljiva razlika u odnosu na kliničke podatke čitave ispitivane grupe bolesnika, jesu ranije godine početka bolesti.

#### **5.3.4.2. Heterozigotni nosioci mutacija u *Parkin* genu**

Dok su homozigotne i složene heterozigotne mutacije u *Parkin* genu nedvosmisleno asocirane sa PB, uloga heterozigotnih mutacija je mnogo neizvesnija. U ranijim studijama je pokazana značajno veća učestalost heterozigotnih *Parkin* mutacija kod bolesnika sa PB u odnosu na kontrole (Pankratz i sar., 2009). Takođe je pokazano da heterozigotne mutacije mogu imati značajan uticaj na godine početka bolesti. Analizom 183 porodica sa PB je utvrđeno je da je bolest prosečno počinjala 11,7 godina ranije kod heterozigotnih nosilaca



*Parkin* mutacije u odnosu na obolele bez mutacija (Sun i sar., 2006). U saglasnosti sa ovim nalazima je i studija Khana i saradnika, u kojoj su asimptomatski nosioci heterozigotnih mutacija u *PARK2* genu imali značajnu strijatnu dopaminergičku disfunkciju, što ukazuje da ovi ispitanici mogu imati haploinsuficijenciju (Khan i sar., 2005). Sa druge strane, velika studija koja je obuhvatila 2091 bolesnika sa PB i 1686 kontrola nije utvrdila statistički značajnu razliku u učestalosti heterozigotnih mutacija u *Parkin* genu u ove dve grupe (Kay i sar., 2010), tako da pitanje da li heterozigotne mutacije u ovom genu povećavaju rizik za razvoj PB ostaje kontroverzno.

Srednje godine početka bolesti kod heterozigotnih nosilaca *Parkin* mutacija u našem istraživanju su bile 48,5 ( $\pm 10,9$ ), dok je raspon godina bio od 27 do 78. Ukoliko uporedimo ovaj podatak sa godinama početka bolesti bolesnika bez mutacija u *Parkin* genu, uočava se da su bolesnici sa jednom mutacijom u proseku 5 godina stariji u trenutku pojave prvih simptoma. Bolesnik sa najkasnijom pojavom prvih simptoma (u 78. godini), je nosilac mutacije p. Pro437Leu, za koju je, kao što je već spomenuto, pokazano da je asocirana sa kasnim početkom bolesti, ili da čak predstavlja benignu promenu (Pankratz i sar., 2009). Ukoliko se isključi navedeni bolesnik, srednje godine početka bolesti heterozigotnih nosilaca mutacija iznose 44,3 ( $\pm 10,9$ ) i ne razlikuju se od srednjih godina početka bolesti bolesnika bez mutacije u *Parkin* genu.

Bitno je ne zanemariti da su rane godine početka bolesti bile jedan od inkluzionih kriterijuma pri odabiru bolesnika za analizu *Parkin* gena i da većina sporadičnih slučajeva sa kasnim godinama početka bolesti nije uključena. Ukoliko bi posmatrali čitavu kohortu bolesnika sa PB koja je analizirana u ovom istraživanju (496 bolesnika), bolest je u proseku počinjala u 53. godini života. U tom slučaju, heterozigotni nosioci mutacija u *Parkin* genu imaju u proseku za 5, odnosno 9 (ukoliko se isključi nosilac p. Pro437Leu mutacije) godina raniji početak bolesti.

Još uvek nije poznato da li se heterozigotne mutacije mogu smatrati patogenim i na koji način mogu ispoljavati efekte. Nekoliko modela može da objasni način delovanja ovih varijanti, kao što je haploinsuficijencija, dominantno-negativan efekat ili dobijanje nove, po

ćeliju nepovoljne funkcije (eng. *gain of function*). Istraživanja ukazuju da se heterozigotne promene u Parkinu mogu smatrati faktorima podložnosti koji nisu neophodan, a ni dovoljan uslov za nastanak PB, ali povećavaju rizik za razvoj bolesti (Klein i sar., 2007).

Sa druge strane, ako se ima u vidu da je PB relativno često oboljenje, može se pretpostaviti da prisustvo heterozigotnih mutacija može biti slučajno i da nije povezano sa bolešću. Da bi se proverila ovakva hipoteza neophodno je bilo utvrditi opštu učestalost nosilaca heterozigotnih mutacija. Nedavna studija sprovedena na 2 evropske kohorte je pokazala da je učestalost heterozigotnih *Parkin* mutacija kod zdravih kontrola 4% (Bruggemann i sar., 2009). U većini studija testiranje zdravih kontrola se vrši samo na mutacije koje su detektovane kod bolesnika, i interesantno je da su rezultati većeg broja studija koje su uključivale bolesnike sa PB kasnog početka i odgovarajuće zdrave kontrole kontradiktorni (Lincoln i sar., 2003; Kay i sar., 2007; Lesage i sar., 2008; Brooks i sar., 2009; Pankratz i sar., 2009). Učestalosti heterozigotnih mutacija kod zdravih kontrola mogu se učiniti veće zbog nedovoljno rigoroznog kliničkog pregleda, kao i zbog nedostatka daljeg praćenja potencijalnog razvoja simptoma bolesti.

Studije su pokazale da asimptomatski nosioci heterozigotnih mutacija u *Parkin* genu mogu imati blage ekstrapiramidalne znake i bihevioralne poremećaje, kao i da pokazuju nigrostrijatalnu disfunkciju (Hilker i sar., 2002; Hagenah i sar., 2007). Takođe je pokazano da mogu ispoljavati hiperehogenost substantie nigre na transkranijalnoj parenhimskoj sonografiji (Hagenah i sar., 2007), diskretne abnormalnosti na vokselima-zasnovanoj morfometriji (Binkofski i sar., 2007), te abnormalnostima elektrofiziološkog odgovora na transkranijalnoj magnetnoj stimulaciji (Baumer i sar., 2007; Schneider i sar., 2008). Međutim, nema jasnih dokaza koji bi mogli da tvrde da su detektovane promene progresivne i da će nedvosmisleno voditi ka nastanku PB.

### **5.3.5. Preporuke za dijagnostičko genetičko testiranje *Parkin* gena**

Genetičko testiranje *Parkin* gena, kao što je već napomenuto, treba da obuhvati analizu sekvence svih kodirajućih regiona ovog gena i analizu broja kopija ovih regiona. Ovakva, sveobuhvatana analiza je vremenski i finansijski zahtevna, tako da je važno napraviti adekvatan odabir bolesnika za testiranje.

U testiranje prvenstveno treba uključiti bolesnike sa tipičnom PB koji imaju pozitivnu porodičnu anamnezu koja ukazuje na autozomno-recesivno nasleđivanje. Pored toga, bolesnici sa ranim, pogotovo juvenilnim početkom bolesti predstavljaju kandidate za genetičko testiranje na prisustvo mutacija u *Parkin* genu, bez obzira na porodičnu anamnezu. U ovoj studiji je 3 od 4 bolesnika sa po 2 mutacije u *Parkin* genu imalo godine početka bolesti pre tridesete godine života i sva tri bolesnika su imala negativnu porodičnu anamnezu. Upravo zbog autozomno-recesivnog tipa nasleđivanja, ovi bolesnici imaju naizgled sporadičnu PB.

Ukoliko porodična anamneza ukazuje na autozomno-dominantno nasleđivanje, ali i ranije godina početka bolesti kod bolesnika i srodnika, a analize na prisustvo mutacija u *LRRK2* i *VPS* genu su negativne, treba razmotriti mogućnost testiranja *Parkin* gena. Zbog već spomenute pojave fenokopija, ali i mogućnosti razvoja simptoma PB kod heterozigotnih nosilaca, nasleđivanje bolesti izazvane *Parkin* mutacijama se može ispoljavati kao naizgled autozomno-dominantno.

## **5.4. Analiza sekvence *GBA* gena**

U ovoj studiji je primenjen selektivni pristup u analizi *GBA* gena koji je obuhvatio 4 od 11 egzona. Ranije studije su pokazale da su najučestalije mutacije sa potvrđenom patogenošću locirane u egzonima 8-11, dok su varijante koje se nalaze u ostalim egzonima retke ili veoma retke (Lesage i sar., 2011a). Imajući u vidu veličinu analiziranog uzorka,

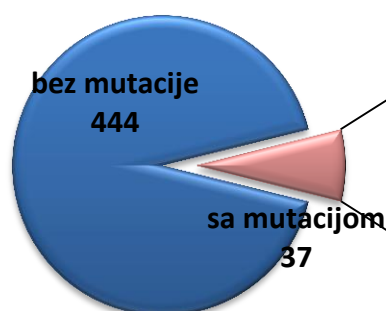
kao i učestalost retkih promena u drugim egzonima *GBA* gena, može se pretpostaviti da analizom preostalih egzona ne bi došlo do značajne promene u ukupnoj učestalosti mutacija. Sa druge strane, postoji i mogućnost da je ovakvim pristupom ipak detektovan manji broj mutacija (Sidransky i sar., 2009).

Kontrolna grupa u kojoj je vršena analiza *GBA* gena je obuhvatila subjekte ranije životne dobi u odnosu na analizirane bolesnike sa PB. Uzimajući u obzir da je prevalenca za nastanak PB tokom života oko 2%, može se zaključiti da će samo mali broj kontrola razviti simptome bolesti u kasnijim godinama. Ukoliko bi se taj broj kontrolnih subjekata isključio iz kontrolne grupe, ne bi bilo značajnog efekta na rezultate.

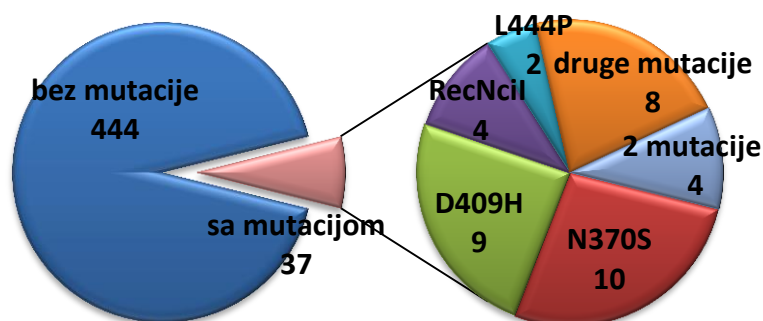
#### 5.4.1. Distribucija promena u kodirajućim regionima *GBA* gena

Učestalost mutacija u *GBA* genu kod bolesnika sa PB je iznosila 7,69% (37/481), dok je kod kontrola bila 1,5% (4/348). Izračunavanjem odnosa šansi je pokazano da je učestalost *GBA* mutacija značajno veća kod bolesnika sa PB u odnosu na učestalost u kontrolnoj grupi (OR= 7,17; CI 2.53–20.3). Ovakvi rezultati ukazuju da, ukoliko se posmatraju sve detektovane mutacije u *GBA* genu kod bolesnika i kod kontrola, mutacije u ovom genu predstavljaju nezavisni faktor rizika za nastanak PB u populaciji Srbije, što se može uočiti i na donjim graficima (Slika 34).

1A

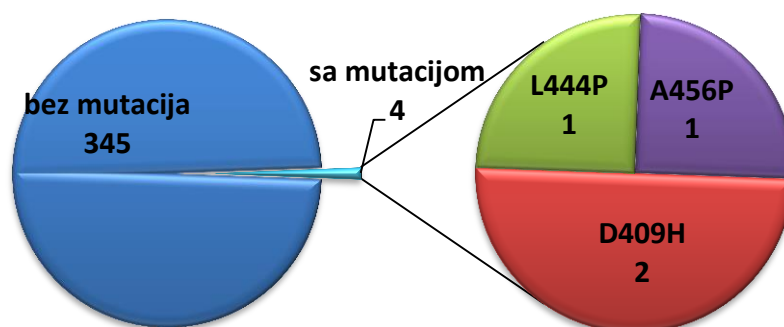


1B



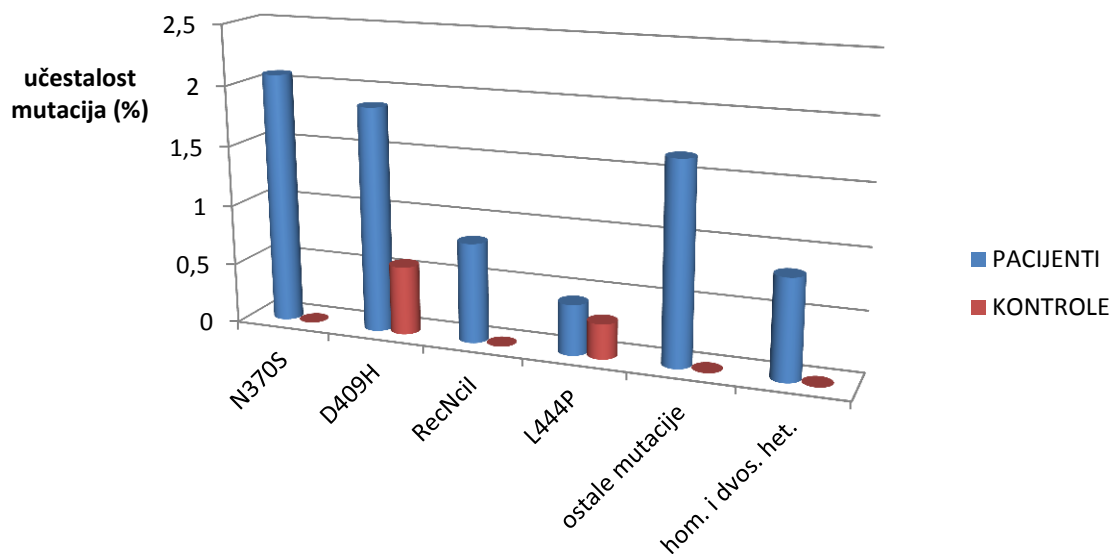
2A

2B



Slika 34. Grafički prikaz broja ispitanika sa i bez mutacija u *GBA* genu. 1A – broj bolesnika sa i bez mutacije; 1B – zastupljenost različitih mutacija kod bolesnika; 2A – broj kontrola sa i bez mutacije; 2B – zastupljenost različitih mutacija kod kontrola.

Ukoliko svaku od opisanih mutacija posmatramo zasebno i poredimo njihove učestalosti kod bolesnika i kod kontrola, uviđa se da se nekoliko mutacija izdavaju po učestalosti u grupi bolesnika (Slika 35.).



Slika 35. Grafički prikaz učestalosti mutacija u *GBA* genu kod bolesnika sa PB i kod kontrola.

Mutacija sa najvećom učestalošću je N370S ja bila zastupljena sa 2,08% kod bolesnika. Interesantno je da ova mutacija nije detektovana ni kod jednog ispitanika iz kontrolne grupe. Učestalost i distribucija mutacije N370S varira u različitim populacijama. Ona predstavlja najčešću mutaciju kod bolesnika sa GB i javlja se u oko 70% mutantnih alela kod Aškenazi Jevreja (Sidransky i sar., 2009), dok je veoma retko prisutna u azijskim populacijama (Wan i sar., 2006). U bazi podataka ExAC (URL: <http://exac.broadinstitute.org>). Opšta učestalost ove promene iznosi 0,00221 (268 alela od 121250). Ova mutacija, za koju je smatrano da je asocirana samo sa neneuropatskom formom GB, se svrstava u blage mutacije.

Druga po učestalosti mutacija kod srpskih bolesnika sa PB je D409H sa učestalošću od 1,87%. U kontrolnoj grupi učestalost ove mutacije je iznosila svega 0,6%, dok je kod asimptomatskih srodnika obolelih bila zastupljena sa 20%. Učestalost ove promene je prema ExAC bazi 0,0001097 (11 alela od 100268) (URL: <http://exac.broadinstitute.org>). D409H mutacija je u GB asocirana sa atipičnim fenotipom (Abrahamov i sar., 1995) i pokazano je da je poreklom iz *GBA* pseudogena (Hruska i sar., 2008). U nekoliko studija koje su testirale bolesnike sa GB iz regiona Balkana, pokazano je da se ova mutacija nalazi *in cis* sa mutacijom H255Q (Michelakakis i sar., 2006; Santamaria i sar., 2008), dok to nije bio slučaj u drugim populacijama. Pored toga, mutacija H255Q do sada nije opisana nezavisno od D409H, a pri tome njeno poreklo nije od *GBA* pseudogena. Ovakvi nalazi ukazuju da je ovaj alel nastao kao posledica dva nezavisna mutaciona događaja, a analize haplotipova su pokazale da svi ispitivani bolesnici imaju zajednički haplotip (Santamaria i sar., 2008). Ista studija je pokazala da homozigoti za ovaj mutirani alel imaju težu kliničku prezentaciju GB u odnosu na bolesnike koji su homozigoti za mutaciju D409H, što ukazuje na kumulativni efekat ovih promena na aktivnost enzima. Nasuprot tome, trodimenzionalna struktura proteina *GBA* ukazuje da se ove dve pozicije nalaze na suprotnim stranama proteina, kao i da se obe promene nalaze van katalitičkog jezgra (Vithayathil i sar., 2009). Takođe, u ovom proteinskom modelu, mutacije na ovim pozicijama nisu ispoljile uticaj na funkcionalni deo proteina, što nije u skladu sa potvrđenom patogenošću i same D409H mutacije kao i kompleksnog D409H;H255Q alela. Kod svih nosilaca D409H mutacije u

našoj studiji je potvrđeno prisustvo i mutacije u H255Q u egzonu 7, koja se nalazi *in cis* sa D4096H na mutiranom alelu, što potvrđuje učestalost ovog alela na teritoriji Balkana.

Mutacija L444P samostalno nije predstavljala značajan faktor rizika za nastanak PB u našoj grupi bolesnika, što se razlikuje od drugih studija gde je ova promena imala veću učestalost (Sidransky i sar., 2009). Ova relativno česta patogena mutacija, koja je vezana isključivo za neuropatsku formu bolesti je dosta česta kod nejevrejskih populacija, bilo da se javlja kao tačkasta mutacija, bilo da je deo kompleksnog rekombinantnog alela (Sidransky i sar., 2009). U našoj studiji je detektovana samostalno samo kod 0,4% bolesnika, kao i kod 0,3% zdravih kontrola.

Veća zastupljenost L444P mutacije je registrovana u okviru kompleksnog alela *RecNciI* [L444P; A456P; V460V], koji je detektovan kod 0,83% bolesnika, dok kod kontrola i asimptomatskih nosilaca nije registrovan. Ovaj alel nastaje kao rezultat nehomologne rekombinacije između funkcionalnog *GBA* gena i visoko homolognog nefunkcionalnog *GBA* pseudogena. Rekombinantni aleli nisu retkost u *GBA* genu i nastaju usled visokog nivoa sličnosti sekvenci gena i pseudogena, kao i njihove blizine (Hruska i sar., 2008).

Druge detektovane mutacije *GBA* genu predstavljaju veoma retke promene, sa jako malom učestalošću. Osim promene R463H koja je opisana kod 2 nesrodna bolesnika, sve ostale retke varijante su detektovane kod pojedinačnih bolesnika.

U osmom egzonu je detektovana promena R329H, koja je prvi put opisana u grčkoj populaciji kod bolesnika sa PB (Kalinderi i sar., 2009). Međutim, softverske predikcije nisu jednoglasne po pitanju patogenosti ove promene (Manickam i sar, 2014). Učestalost ove promene prema ExAC bazi je svega 6 alela od 121354 analiziranih (URL: <http://exac.broadinstitute.org>), tako da ona predstavlja ili mutaciju koja nema veliki uticaj na proteinskom nivou ili izuzetno redak polimorfizam. Na ovoj poziciji je opisana još jedna mutacija R329C, prvo kod bolesnika sa PB (Lwin i sar., 2004), a zatim i kod bolesnika sa GB (Rozenberg i sar., 2006).

Pored ove promene, u osmom egzonu se nalazi i T369M polimorfizam koji je u našoj studiji detektovan na 24 alela (22 heterozigota i 1 homozigot) što predstavlja učestalost ovog alela od 2,49% (24/962) kod bolesnika. U kontrolnoj grupi učestalost alela je iznosila 1,87% (13/696). Izračunavanjem odnosa šansi utvrđeno je da se ove učestalosti značajno ne razlikuju između grupe bolesnika i kontrola (OR= 1.34; CI 0.68–2.66).

U devetom egzonu je detektovano nekoliko veoma retkih promena. Mutacija D380V je prvi put opisana kod našeg bolesnika, iako je na ovoj poziciji do sada opisan veći broj promena (D380N, D380H, D380Y i D380A) koje su asocirane sa GB (Kumar i sar., 2013). Ove mutacije pogađaju nekonzerviranu poziciju u proteinu i dovode do promena fizičko-hemijskih svojstava, kao što su naelektrisanje i masa. Nedavne funkcionalne studije mutacije D380N ukazuju da ona uzrokuje potpuno ukidanje funkcije proteina (Malini i sar., 2014), što govori u prilog patogenosti promena koje pogađaju aspartinsku kiselinu na poziciji 419 u proteinu. Interesantno je da je jedna od navedenih mutacija, D380Y, takođe opisana kod jednog bolesnika koji je bio balkanskog porekla i imao neuropatsku formu GB (Santamaria i sar., 2008). *In silico* analize nove mutacije D380V su bile konzistentne po pitanju patogenosti i kod svih primenjenih softvera promena je bila patogena sa visokom pouzdanošću i verovatnoćom.

Pored ove mutacije detektovane su i dve mutacije koje pogađaju susedne aminokiseline P391L i N392S. Mutacija P391L je već opisana u literaturi, ali kod bolesnika sa GB u Španiji (Cormand i sar., 1998). Funkcionalne analize u kojima je mutirana cDNK za beta-glukocerebrozidazu introdukovana u COS-1 ćelije, a zatim merena aktivnost enzima u odnosu na nemutirani enzim, pokazale su da zamena prolina leucinom na poziciji p.430 smanjuje enzimsku aktivnost na 8,5% (Torralba i sar., 2001), dok je kasnija studija na Sf9 ćelijama uočila zanemarljiv efekat ove mutacije (Montfort i sar., 2004).

Promena N392S je prvi put opisana kod jednog bolesnika sa PB srpskog porekla (Kumar i sar., 2013). Prema dostupnim demografskim podacima, ovaj bolesnik i bolesnik iz naše studije nisu u srodstvu, ali njihova etnička pripadnost ukazuje na zajedničko poreklo mutiranog alela. *In silico* analiza je pokazala, sa veoma velikom pouzdanošću primenom



nekoliko softvera da ova promena može biti patogena. Na ovoj poziciji je u već spomenutoj španskoj studiji, kod bolesnika sa GB, prvi put opisana promena N392I koja nastaje usled supstitucije iste baze c.1292A (Cormand i sar., 1998). Kasnije funkcionalne analize na Sf9 ćelijama nisu uspele da dokažu uticaj ove promene na aktivnost enzima beta-glukocerebrozidaze (Montfort i sar., 2004), dok je *in silico* analiza okarakterisala kao patogenu prema nekoliko softvera – SIFT, MutPred, nsSNP Analyzer, PROVEAN, SNPs&GO (Manickam i sar, 2014).

U desetom egzonu je detektovana promena A456P koja se najčešće nalazi u okviru kompleksnog rekombinantnog alela RecNciI, ali koja samostalno ne predstavlja patogenu promenu prema softverskoj predikciji. U našoj studiji je detektovana samo kod jednog ispitanika iz kontrolne grupe, što govori u prilog tome da A456P može imati modifikujući efekat na mutirani protein, ali da samostalno ne predstavlja patogenu promenu.

Na poziciji 463 u proteinu detektovane su dve različite supstitucije. Kod dva bolesnika arginin je zamenjen histidinom (R463H), dok je kod jednog zamena izvršena cisteinom (R463C). Intresantno je da su ove promene posledica supstitucija na dva susedna nukleotida. Mutacija R463C je zabeležena u ExAC bazi kod 7 od 121382 analizirana alela, od čega su 4 bila evropskog, a 3 južnoazijskog porekla (URL: <http://exac.broadinstitute.org>). Ova mutacija se prema većem broju predikcionih softvera (SIFT, MutPred) smatra patogenom (Manickam i sar, 2014). Sa druge strane promena R463H je opisana samo kod jednog alela u ExCA bazi, dok se njena patogenost razlikuje prema različitim softverima. Prema Mutation Tasteru ova mutacija je patogena sa koeficijentom od 0,99, dok je prema SIFT softveru podnošljiva.

#### **5.4.2. GBA gen: Korelacije genotipa sa fenotipom**

U nekoliko predhodnih studija je uočen raniji početak bolesti kod *GBA* asocirane PB, kao i veća zastupljenost različitih nemotornih simptoma. Simptomi koje se češće javljaju u okviru PB kod nosilaca *GBA* mutacije su kognitivni deficit, neuropsihijatrijske

smetnje, halucinacije i autonomne disfunkcije (Neumann i sar., 2009; Sidransky i sar., 2009; Brockmann i sar., 2011; Alcalay i sar., 2012).

Velika studija u populaciji Aškenazi Jevreja u Izraelu je pokazala različite efekte *GBA* mutacija na rizik za nastanak PB, kao i samu prezentaciju bolesti (Gan-Or i sar., 2008). Teške mutacije su povećavale rizik za nastanak PB 13,6 puta, smanjivale godine početka bolesti na 55,7 u odnosu na prosečne godine početka bolesti (60,7 godina) kod bolesnika koji nisu nosioci *GBA* mutacija. Takođe su bile povezane sa kognitivnim simptomima kod 55,6% bolesnika. Blage mutacije su povećavale rizik za razvoj bolesti samo 2,2 puta, smanjivale prosečne godine početka na 57,9 godina i bile asocirane sa kognitivnim simptomima kod 25% bolesnika.

U našoj studiji godine početka bolesti bolesnika sa mutacijama u *GBA* genu se nisu razlikovale u odnosu na godine početka bolesti ostalih bolesnika sa PB. U analiziranu grupu je uključen veliki broj bolesnika sa ranim početkom bolesti, tako da su u poređenju sa gore navedenom studijom godine početka u našoj ispitivanoj grupi su bile značajno niže (53,7 godina). Može se pretpostaviti da je to razlog zbog koga nije zapažen efekat mutacija u *GBA* genu na godine početka bolesti. Pored toga, razlike nisu uočene ni u pogledu raspodele polova i porodične istorije između bolesnika sa i bez mutacija.

Klinička prezentacija bolesti kod nosilaca mutacije u *GBA* genu se u većini simptoma nije razlikovala od sporadične PB. Prvi simptomi su najčešće zahvatili ruku ili rameni region u obe grupe bolesnika, kod nosilaca *GBA* mutacije u 68,7% slučajeva, a kod bolesnika bez mutacija u 65,6% slučajeva. Najzastupljeniji prvi simptom je bio tremor koji se javljao kod 40,7% bolesnika sa mutacijom i kod 49,3% bolesnika bez mutacije. Bradikinezija i ukočenost su se javljali kod 28,1%, odnosno 18,7% bolesnika sa mutacijom i kod 29,1%, odnosno 15,3% bolesnika bez mutacije. Ovakvi nalazi su u saglasnosti sa podacima iz literature (Gan-Or i sae., 2010).

Jedini simptom koji je imao značajno veću učestalost u grupi bolesnika koji su imali mutacije u *GBA* genu u odnosu na bolesnike bez mutacija jeste bol. U prvoj grupi bol je kao inicijalni simptom imalo 12,5% bolesnika, dok je u drugoj grupi imalo 3,9% bolesnika. U

obe grupe se ovaj simptom javljao najčešće na gornjim ekstremitetima, kod 14 od 16 bolesnika bez mutacija i kod sva 4 bolesnika sa mutacijama. Tri bolesnika sa bolom kao inicijalnim simptomom su bili heterozigotni nosioci [D409H;H255Q] kompleksnog mutiranog alela, koji spada u teške mutacije, dok je jedan bolesnik bio heterozigotni nosilac R463H mutacije. Sličnu učestalost bola kao inicijalnog simptoma kod nosilaca *GBA* mutacija je pokazala i gore navedena velika studija (Gan-Or i sar., 2008), u kojoj se bol javljao kod 9,9% bolesnika. Za razliku od naše studije, zastupljenost bola je bila nešto veća kod bolesnika bez mutacija, približno 6%, tako da razlika nije bila statistički značajna.

U okviru subgrupe bolesnika sa i bez *GBA* mutacija, asimptomatskih nosilaca *GBA* mutacija, bolesnika sa GB, kao i neurološki zdravih kontrola, ispitivana je hiperehogenost supstancije nigre transkranijalnom sonografijom (TCS) (Kresojević i sar., 2013). Ranija istraživanja su pokazala da se TCS-om mogu detektovati promene karakteristične za PB, u oko 90% slučajeva kako sporadične, tako i monogenske PB (Berg i sar., 2008), ali i kod približno 10% zdravih kontrola. Hiperehogenost SN se detektuje i u predijagnostičkoj fazi PB i nije pokazana korelacija između progresije bolesti i veličine promena na TCS (Berg i sar., 2008). Rezultati ispitivanja naše grupe bolesnika su pokazali da se nalazi TCS kod bolesnika sa PB koji su nosioci *GBA* mutacije ne razlikuju od nalaza bolesnika sa PB bez mutacija u *GBA* genu. Sa druge strane, hiperehogenost SN je bila značajno veća kod svih bolesnika sa PB u odnosu na zdrave kontrole i asimptomatske nosioce *GBA* heterozigotnih mutacija. Ovakvi nalazi su u skladu sa ranijim studijama koje su pokazale da se hiperehogenost SN detektuje u autozomno-dominantnim i autozomno-recesivnim formama PB (Schweitzer i sar., 2007; Hagenah i sar., 2007; Hagenah i sar., 2008; Brüggemann i sar., 2011).

### **5.4.3. Preporuke za dijagnostičko genetičko testiranje *GBA* gena**

Genetičko testiranje *GBA* gena kod bolesnika sa PB treba ograničiti na odabrane egzone 8-11. Imajući u vidu da u ovoj studiji, kao i u prethodnoj studiji koja je obuhvatila bolesnike srpskog etničkog porekla, nije detektovana nijedna promena u jedanaestom

egzonu, kao i da mutacije u ovom egzonu nisu česte ni kod bolesnika sa GB, kao ni sa PB, analiza ovog egzona se može izostaviti, ili ostaviti kao alternativa.

U testiranje bi trebalo uključiti bolesnike sa tipičnom prezentacijom PB, sa pozitivnom porodičnom anamnezom, kao i sporadične slučajeve.

Prilikom davanja genetičkog saveta, bitno je imati u vidu da mutacije u *GBA* genu predstavljaju faktor rizika za razvoj PB.

## **6.     *Zaključci***

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva i rezultata dobijenih u ovom istraživanju, doneti su sledeći zaključci:

1. Utvrđeni su distribucija i spektar mutacija u genima *PARK2*, *LRRK2*, *VPS35* i *GBA* kod bolesnika sa Parkinsonovom bolešću na teritoriji Srbije.
  - Analizirani su kodirajući regioni *LRRK2* gena u kojima su locirane poznate patogene mutacije kod 496 bolesnika sa dijagnozom Parkinsonove bolesti i dobijeni su sledeći rezultati:
    - četiri različite mutacije promenjenog smisla (c.4111A>G, c.4522A>G, c.5971A>G i c.6055G>A) su detektovane kod četiri bolesnika i jedna mutacija koja remeti mesto za iskrajanje egzona (c.4536+3A>G) kod dva nesrodna bolesnika;
    - dve mutacije koje do sada nisu opisane u literaturi (c.4522A>G i c.5971A>G) nisu detektovane kod 286 kontrolnih hromozoma, dok je mutacija koja remeti mesto za iskrajanje egzona (c.4536+3A>G) detektovana kod 3 kontrolna hromozoma;
    - efekat novih mutacija na funkciju proteina i njihova patogenost nisu sa sigurnošću pokazani *in silico* analizom;
    - ukupna učestalost mutacija u *LRRK2* genu je iznosila 1,21% i u saglasnosti je sa do sada objavljenim vrednostima u literaturi;
    - učestalost najčešće mutacije u *LRRK2* genu, c.6055G>A, je iznosila 0,2% i bila je manja od učestalosti ove mutacije kod bolesnika iz drugih evropskih studija.

- Analizirano je 496 bolesnika sa dijagnozom Parkinsonove bolesti na prisustvo poznate patogene mutacije u kodirajućem regionu *VPS35* gena i promena nije detektovana ni kod jednog bolesnika. Ovakvi nalazi su u saglasnosti sa rezultatima drugih studija i ukazuju da *PARK17* nije česta forma Parkinsonove bolesti kod bolesnika na teritoriji Srbije.
- Analizirano je 225 bolesnika sa ranim početkom bolesti i/ili pozitivnom porodičnom anamnezom za Parkinsonovu bolest na prisustvo mutacija u *Parkin* genu (promene u sekvenci kodirajućih regiona i promene u broju kopija kodirajućih regiona) i dobijeni su sledeći nalazi:
  - četiri bolesnika su bila složeni heterozigoti (homozigotna duplikacija od petog do sedmog egzona i heterozigotna duplikacija četvrtog egzona; duplikacija egzona 3 i c.101\_102delAG; homozigotna delecija egzona 2 i heterozigotna delecija egzona 3; c.167T>A i c.758G>A);
  - sedam različitih heterozigotnih promena je detektovano kod 8 bolesnika (delecija egzona 2, triplikacija egzona 3, duplikacija egzona 4, c.245C>A, c.399\_400insCCA, c.823C>T i c.1310C>T);
  - detektovane su dve nove promene kod pojedinačnih bolesnika (c.469G>A i c.583G>A), koje su in silico analizom opisane kao benigne.
- Analizirani su odabrani kodirajući regioni *GBA* gena, sa najvećom učestalošću patogenih mutacija, kod 481 bolesnika sa Parkinsonovom bolešću, 348 kontrola i 15 srodnika obolelih od Goševove bolesti i dobijeni su sledeći nalazi:
  - ukupno je detektovano 58 heterozigotnih promena kod bolesnika sa Parkinsonovom bolešću, 3 složeni heterozigotnih i 1 homozigotna promena kod bolesnika sa Parkinsonovom i Goševom bolešću, 12 heterozigotnih promena kod srodnika bolesnika sa Goševom bolešću i 17 heterozigotnih promena u grupi kontrola;

- detektovane promene predstavljaju supstitucije promenjenog smisla: c.1103G>A, c.1223C>T, c.1226A>G, c.1256A>T, c.1289C>T, c.1292A>G, c.1448T>C, c.1504C>T, c.1505G>A, kao i kompleksne alele: RecΔ5 (c.1263–1317del55), RecNcil (c.1448T>C, c.1483G>C, c.1497G>C) i D409H;H255Q (c.1342G>C, c.882T>G);
  - ukupna učestalost mutacija u *GBA* genu je iznosila 7,7% (37/481) kod bolesnika i bila je značajano veća u odnosu na učestalost mutacija kod kontola koja je iznosila 1,5% (4/348).
2. Ispitane su potencijalne korelacije između genotipa i fenotipa kod bolesnika sa utvrđenim mutacijama:
- fenotipske karakteristike nosilaca mutacija u *LRRK2* genu se nisu značajno razlikovale od kliničke prezentacije bolesti kod bolesnika bez mutacija, dok je učestalost ženskog pola kod nosilaca mutacija iznosila 83% (5/6) i bila je značajno veća nego kod bolesnika bez mutacija kod kojih je iznosila 38% (186/490);
  - bolesnici sa dve mutacije u *Parkin* genu su imali raniji početak bolesti u odnosu na bolesnike sa jednom mutacijom i bolesnike bez mutacija u ovom genu, dok ostale kliničke karakteristike nisu pokazivale razliku u ispoljavanju u navedenim grupama;
  - kod nosilaca mutacija u *GBA* genu, klinička prezentacija bolesti se prema godinama početka bolesti, distribuciji polova i većini inicijalnih simptoma nije razlikovala u odnosu na bolesnike bez mutacija. Jedino se bol kao inicijalni simptom javljao kod 12,5% bolesnika sa mutacijom u *GBA* genu, dok se kod bolesnika bez mutacije javljao u 3,9% slučajeva.
3. Na osnovu učestalosti i spektra mutacija u analiziranim genima i korelacije genotipa sa fenotipom bolesnika, kao i na osnovu dosadašnjih podataka iz literature, formirane su preporuke za protokol dijagnostičkog genetičkog testiranja:



- analizirati *LRRK2* gen kod bolesnika sa tipičnom Parkinsonovom bolešću kasnog početka, bolesnika sa nešto ranijim početkom bolesti ( $\geq 40$  godina) i/ili pozitivnom porodičnom anamnezom za Parkinsonovu bolest, bolesnika ženskog pola sa pozitivnom porodičnom anamnezom, bez obzira na godine početka;
- analizirati *VPS35* gen kod bolesnika sa tipičnom Parkinsonovom bolešću kasnog početka i pozitivnom porodičnom anamnezom koja jasno ukazuje na autozomno-dominantno nasleđivanje, a kod kojih nije utvrđeno prisustvo mutacija u *LRRK2* genu;
- analizirati *Parkin* gen kod bolesnika sa ranim početkom bolesti i pozitivnom porodičnom anamnezom i bolesnika sa početkom bolesti pre tridesete godine života bez obzira na porodičnu anamnezu;
- analizirati *GBA* gen, kao jedan od faktora rizika, kod bolesnika sa tipičnom Parkinsonovom bolešću.

## **7. *Literatura***

## 7. LITERATURA

- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491(7422):56-65.
- Aasly JO, Vilarino-Guell C, Dachsel JC, Webber PJ, West AB, Haugarvoll K, Johansen KK, Toft M, Nutt JG, Payami H, Kachergus JM, Lincoln SJ, Felic A, Wider C, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, White LR, Ross OA, Farrer MJ. Novel pathogenic LRRK2 p.Asn1437His substitution in familial Parkinson's disease. *Mov Disord* 2010;25:2156–2163.
- Abbas N, Lücking CB, Ricard S, Dürr A, Bonifati V, De Michele G, Bouley S, Vaughan JR, Gasser T, Marconi R, Broussolle E, Brefel-Courbon C, Harhangi BS, Oostra BA, Fabrizio E, Böhme GA, Pradier L, Wood NW, Filla A, Meco G, Deneffe P, Agid Y, Brice A. A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet.* 1999;8(4):567-74.
- Abou-Sleiman PM, Healy DG, Quinn N, Lees AJ, Wood NW. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54(3):283–286.
- Abou-Sleiman PM, Muqit MM, McDonald NQ, Yang YX, Gandhi S, Healy DG, Harvey K, Harvey RJ, Deas E, Bhatia K, Quinn N, Lees A, Latchman DS, Wood NW. A heterozygous effect for PINK1 mutations in Parkinson's disease? *Ann Neurol* 2006;60(4):414–419.
- Abrahamov A, Elstein D, Gross-Tsur V, Farber B, Glaser Y, Hadas-Halpern I, Ronen S, Tafakjdi M, Horowitz M, Zimran A. Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *Lancet* 1995;346(8981):1000-3.

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 2010; 7: 248-249.
- Alcalay RN, Caccappolo E, Mejia-Santana H, Tang M-, Rosado L, Orbe Reilly M, Ruiz D, Ross B, Verbitsky M, Kisselev S, Louis E, Comella C, Colcher A, Jennings D, Nance M, Bressman S, Scott WK, Tanner C, Mickel S, Andrews H, Waters C, Fahn S, Cote L, Frucht S, Ford B, Rezak M, Novak K, Friedman JH, Pfeiffer R, Marsh L, Hiner B, Siderowf A, Payami H, Molho E, Factor S, Ottman R, Clark LN, Marder K. Cognitive performance of *GBA* mutation carriers with early-onset PD: the CORE-PD study. *Neurology* 2012;78(18):1434-40.
- Anderson PC, Daggett V. Molecular basis for the structural instability of human DJ-1 induced by the L166P mutation associated with Parkinson's disease. *Biochemistry* 2008;47(36):9380–9393.
- Ando M, Funayama M, Li Y, Kashihara K, Murakami Y, Ishizu N, Toyoda C, Noguchi K, Hashimoto T, Nakano N, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Ogaki K, Yamashita C, Yoshino H, Hatano T, Tomiyama H, Hattori N. *VPS35* mutation in Japanese patients with typical Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2012;27(11):1413-7.
- Antonini A, Tolosa E, Mizuno Y, Yamamoto M, Poewe WH. A reassessment of risks and benefits of dopamine agonists in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2009;8(10):929-37.
- Asakawa S, Tsunematsu Ki, Takayanagi A, Sasaki T, Shimizu A, Shintani A, Kawasaki K, Mungall AJ, Beck S, Minoshima S, Shimizu N. The genomic structure and promoter region of the human parkin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286(5):863–868.
- 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: 355–358.
- Baumer T, Pramstaller PP, Siebner HR, Schippling S, Hagenah J, Peller M, Gerloff C, Klein C, Munchau A. Sensorimotor integration is abnormal in asymptomatic Parkin mutation carriers: a TMS study. *Neurology* 2007;69: 1976–1981.

- Bembi B, Zambito Marsala S, Sidransky E, Ciana G, Carrozzi M, Zorzon M, Martini C, Gioulis M, Pittis MG, Capus L. Gaucher's disease with Parkinson's disease: clinical and pathological aspects. *Neurology*. 2003;61(1):99-101.
- Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*. 2013;79(6):1044-66.
- Berg D, Schweitzer K, Leitner P, Zimprich A, Lichtner P, Belcredi P, Brussel T, Schulte C, Maass S, Nagele T. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease. *Brain* 2005;128: 3000–3011.
- Berg D, Godau J, Walter U. Transcranial sonography in movement disorders. *Lancet Neurol* 2008;7(11):1044-55.
- Berger CW and Sultatos LG. The effects of the phosphorothioate insecticide fenitrothion on mammalian cytochrome P450-dependent metabolism of estradiol. *Fundam Appl Toxicol* 1997; 37(2): 150-7.
- Berwick DC, Harvey K. LRRK2 signaling pathways: the key to unlocking neurodegeneration? *Trends Cell Biol* 2011;21:257–265.
- Beutler E, Gelbart T, Scott CR. Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 2005;35: 355–364.
- Bialecka M, Hui S, Klodowska-Duda G, Opala G, Tan EK, Drozdik M. Analysis of LRRK2 G2019S and I2020T mutations in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2005;390: 1–3.
- Binkofski F, Reetz K, Gaser C, Hilker R, Hagenah J, Hedrich K, van Eimeren T, Thiel A, Buchel C, Pramstaller PP, Siebner HR, Klein C. Morphometric fingerprint of asymptomatic Parkin and PINK1 mutation carriers in the basal ganglia. *Neurology* 2007;69: 842–850.
- Biskup S, Moore DJ, Celsi F, Higashi S, West AB, Andrabi SA, Kurkinen K, Yu SW, Savitt JM, Waldvogel HJ, Faull RL, Emson PC, Torp R, Ottersen OP, Dawson TM, Dawson VL. Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann Neurol* 2006;60: 557–569.

- Blanckenberg J, Ntsapi C, Carr JA, Bardien S. EIF4G1 R1205H and VPS35 D620N mutations are rare in Parkinson's disease from South Africa. *Neurobiol Aging*. 2014;35(2):445.e1-3.
- Bonifacino JS, Rojas R. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7: 568–579.
- Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G, Heutink P. DJ-1(PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci* 2003;24(3):159–160.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 2003;299(5604):256–259. a
- Bonifati V, Rohé CF, Breedveld GJ, Fabrizio E, De Mari M, Tassorelli C, Tavella A, Marconi R, Nicholl DJ, Chien HF, Fincati E, Abbruzzese G, Marini P, De Gaetano A, Horstink MW, Maat-Kievit JA, Sampaio C, Antonini A, Stocchi F, Montagna P, Toni V, Guidi M, Dalla Libera A, Tinazzi M, De Pandis F, Fabbrini G, Goldwurm S, de Klein A, Barbosa E, Lopiano L, Martignoni E, Lamberti P, Vanacore N, Meco G, Oostra BA; Italian Parkinson Genetics Network. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology* 2005;65(1):87–95.
- Bonifati V. LRRK2 low-penetrance mutations (Gly2019Ser) and risk alleles (Gly2385Arg)-Linking Familial and Sporadic Parkinson's Disease. *Neurochem Res* 2007;32:1700–8.
- Bonifati V. Genetics of Parkinson's disease – state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20:23-28.
- Bosgraaf L, Van Haastert PJ. Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 2003;1643: 5–10.

- Braak H, Del Tredici K, Bratzke H, Hamm-Clement J, Sandmann-Keil D, Rüb U. Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). *J Neurol*. 2002;249 Suppl 3:III/1-5.
- Bras J, Verloes A, Schneider SA, Mole SE, Guerreiro RJ. Mutation of the parkinsonism gene ATP13A2 causes neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Hum Mol Genet* 2012;21:2646–50.
- Bras JM, Guerreiro RJ, Ribeiro MH, Januario C, Morgadinho A, Oliveira CR, Cunha L, Hardy J, Singleton A. G2019S dardarin substitution is a common cause of Parkinson's disease in a Portuguese cohort. *Mov Disord* 2005;20: 1653–1655.
- Braschi E, Goyon V, Zunino R, Mohanty A, Xu L, McBride HM. Vps35 mediates vesicle transport between the mitochondria and peroxisomes. *Curr Biol* 2010;20(14):1310-5.
- Brockmann K, Srulijes K, Hauser AK, Schulte C, Csoti I, Gasser T, Berg D. *GBA*-associated PD presents with nonmotor characteristics. *Neurology* 2011;77(3):276-80.
- Brooks J, Ding J, Simon-Sanchez J, Paisan-Ruiz C, Singleton AB, Scholz SW. Parkin and PINK1 mutations in early-onset Parkinson's disease: comprehensive screening in publicly available cases and control. *J Med Genet* 2009;46(6):375–381.
- Brüggemann N, Hagenah J, Stanley K, Klein C, Wang C, Raymond D, Ozelius L, Bressman S, Saunders-Pullman R. Substantia nigra hyperechogenicity with LRRK2 G2019S mutations. *Mov Disord* 2011;26(5):885-8.
- Brüggemann N, Mitterer M, Lanthaler AJ, Djarmati A, Hagenah J, Wiegers K, Winkler S, Pawlack H, Lohnau T, Pramstaller PP, Klein C, Lohmann K. Frequency of heterozygous Parkin mutations in healthy subjects: need for careful prospective follow-up examination of mutation carriers. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15: 425–429.
- Butler, A.M. and M. Murray. Biotransformation of parathion in human liver: participation of CYP3A4 and its inactivation during microsomal parathion oxidation. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280(2): 966-973.
- Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat*. 2009;30(8):1237-44.

- Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, Baptista MJ, Ringe D, Petsko GA, Cookson MR. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteinesulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(24):9103–9108.
- Caudle WM, Colebrooke RE, Emson PC, Miller GW. Altered vesicular dopamine storage in Parkinson's disease: a premature demise. *Trends Neurosci* 2008;31:303–308.
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ. “Rejuvenation” protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 2007;447: 1081–1086.
- Chartier-Harlin MC, Dachsel JC, Vilariño-Güell C, Lincoln SJ, Leprêtre F, Hulihan MM, Kachergus J, Milnerwood AJ, Tapia L, Song MS, Le Rhun E, Mutez E, Larvor L, Dufлот A, Vanbesien-Mailliot C, Kreisler A, Ross OA, Nishioka K, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Melrose HL, Behrouz B, Keeling BH, Bacon JA, Hentati E, Williams L, Yanagiya A, Sonenberg N, Lockhart PJ, Zubair AC, Uitti RJ, Aasly JO, Krygowska-Wajs A, Opala G, Wszolek ZK, Frigerio R, Maraganore DM, Gosal D, Lynch T, Hutchinson M, Bentivoglio AR, Valente EM, Nichols WC, Pankratz N, Foroud T, Gibson RA, Hentati F, Dickson DW, Destée A, Farrer MJ. Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011;89:398–406.
- Cho JW, Kim SY, Park SS, Jeon BS. The G2019S LRRK2 mutation is rare in Korean patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Clin Neurol* 2009;5: 29–32.
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*. 2012;7(10):e46688.
- Cilia R, Siri C, Rusconi D, Allegra R, Ghiglietti A, Sacilotto G, Zini M, Zecchinelli AL, Asselta R, Duga S, Paganoni AM, Pezzoli G, Seia M, Goldwurm S. LRRK2 mutations in Parkinson's disease: confirmation of a gender effect in the Italian population. *Parkinsonism Relat Disord* 2014;20(8):911-4.
- Civitelli D, Tarantino P, Nicoletti G, Ciro Candiano IC, Annesi F, De Marco EV, Carrideo S, Rocca FE, Condino F, Spadafora P, Pugliese P, D'Asero S, Morelli M, Paglionico S,



- Annesi G, Quattrone A. LRRK2 G6055A mutation in Italian patients with familial or sporadic Parkinson's disease. *Clin Genet* 2007;71: 367–370.
- Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA, Guo M. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006;441(7097):1162–6.
- Clark LN, Ross BM, Wang Y, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K. Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2007;69: 1270–1277.
- Clark LN, Kartsaklis LA, Wolf Gilbert R, Dorado B, Ross BM, Kisselev S, Verbitsky M, Mejia-Santana H, Cote LJ, Andrews H, Vonsattel JP, Fahn S, Mayeux R, Honig LS, Marder K. Association of glucocerebrosidase mutations with dementia with lewy bodies. *Arch Neurol* 2009;66: 578–583.
- Cookson MR, Lockhart PJ, McLendon C, O'Farrell C, Schlossmacher M, Farrer MJ. RING finger 1 mutations in Parkin produce altered localization of the protein. *Hum Mol Genet* 2003;12(22): 2957–2965.
- Cormand B, Grinberg D, Gort L, Chabás A, Vilageliu L. Molecular analysis and clinical findings in the Spanish Gaucher disease population: putative haplotype of the N370S ancestral chromosome. *Hum Mutat* 1998;11(4):295-305.
- Correia Guedes L, Ferreira JJ, Rosa MM, Coelho M, Bonifati V, Sampaio C. Worldwide frequency of G2019S LRRK2 mutation in Parkinson's disease: a systematic review. *Parkinsonism Relat Disord* 2010; 16: 237-242.
- Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev.* 2011;91(4):1161-1218.
- Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med.* 1967. 276(7):374-9.
- Criscuolo C, Volpe G, De Rosa A, Varrone A, Marongiu R, Mancini P, Salvatore E, Dallapiccola B, Filla A, Valente EM, De Michele G. PINK1 homozygous W437X mutation in a patient with apparent dominant transmission of parkinsonism. *Mov Disord* 2006;21: 1265–1267.

- Cruts M, Theuns J, Van Broeckhoven C. Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum Mutat.* 2012;33(9):134.
- Da Costa CA, Sunyach C, Giaime E, West A, Corti O, Brice A, Safe S, Abou-Sleiman PM, Wood NW, Takahashi H, Goldberg MS, Shen J, Checler F. Transcriptional repression of p53 by parkin and impairment by mutations associated with autosomal recessive juvenile Parkinson's disease. *Nat Cell Biol* 2009;11: 1370–1375.
- Darios F, Corti O, Lucking CB, Hampe C, Muriel MP, Abbas N, Gu WJ, Hirsch EC, Rooney T, Ruberg M, Brice A. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. *Hum Mol Genet* 2003;12(5):517–526.
- Davis, G., A. Williams, and S. Markey, Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine. *Psychiatry Research* 1979;1:249-254.
- Dekker MC, van Swieten JC, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ, Boeren E, Hofman A, Breteler MM, Heutink P, Oostra BA, van Duijn CM. A clinical-genetic study of Parkinson's disease in a genetically isolated community. *J Neurol* 2003;250(9):1056–1062.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat.* 2000;15(1):7-12.
- Deng H, Le WD, Hunter CB, Ondo WG, Guo Y, Xie WJ, Jankovic J. Heterogeneous phenotype in a family with compound heterozygous parkin gene mutations. *Arch Neurol* 2006;63: 273–277.
- Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105: 14503–14508.
- DePaolo J, Goker-Alpan O, Samaddar T, Lopez G, Sidransky E. The association between mutations in the lysosomal protein glucocerebrosidase and parkinsonism. *Mov Disord* 2009;24: 1571–1578.
- Deuschl G, Schade-Brittinger C, Krack P, Volkmann J, Schäfer H, Bötzel K, Daniels C, Deuschländer A, Dillmann U, Eisner W, Gruber D, Hamel W, Herzog J, Hilker R, Klebe S, Kloss M, Koy J, Krause M, Kupsch A, Lorenz D, Lorenzl S, Mehdorn HM,

- Moringlane JR, Oertel W, Pinsker MO, Reichmann H, Reuss A, Schneider GH, Schnitzler A, Steude U, Sturm V, Timmermann L, Tronnier V, Trottenberg T, Wojtecki L, Wolf E, Poewe W, Voges J; German Parkinson Study Group, Neurostimulation Section. A randomized trial of deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2006 Aug 31;355(9):896-908. Erratum in: *N Engl J Med.* 2006 Sep 21;355(12):1289.
- Di Fonzo A, Tassorelli C, De Mari M, Chien HF, Ferreira J, Rohe CF, Riboldazzi G, Antonini A, Albani G, Mauro A, Marconi R, Abbruzzese G, Lopiano L, Fincati E, Guidi M, Marini P, Stocchi F, Onofrij M, Toni V, Tinazzi M, Fabbrini G, Lamberti P, Vanacore N, Meco G, Leitner P, Uitti RJ, Wszolek ZK, Gasser T, Simons EJ, Breedveld GJ, Goldwurm S, Pezzoli G, Sampaio C, Barbosa E, Martignoni E, Oostra BA, Bonifati V. Comprehensive analysis of the LRRK2 gene in sixty families with Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet* 2006;14: 322–331. a
- Di Fonzo A, Wu-Chou YH, Lu CS, van Doeselaar M, Simons EJ, Rohe CF, Chang HC, Chen RS, Weng YH, Vanacore N, Breedveld GJ, Oostra BA, Bonifati V. A common missense variant in the LRRK2 gene, Gly2385Arg, associated with Parkinson's disease risk in Taiwan. *Neurogenetics* 2006;7(3):133–138.b
- Di Fonzo, A., Dekker, M. C. J., Montagna, P., Baruzzi, A., Yonova, E. H., Correia Guedes, L., Szczerbinska, A., Zhao, T., Dubbel-Hulsman, L. O. M., Wouters, C. H., de Graaff, E., Oyen, W. J. G., Simons, E. J., Breedveld, G. J., Oostra, B. A., Horstink, M. W., Bonifati, V. *FBXO7* mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 2009;72: 240-245.
- Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stolz DB, Dorn GW 2nd, Yin XM. Nix is critical to two distinct phases of mitophagy: reactive oxygen species (ROS)-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondria priming. *J Biol Chem* 2010; 285: 27878–27890.
- Djarmati A, Hedrich K, Svetel M, Schäfer N, Juric V, Vukosavic S, Hering R, Riess O, Romac S, Klein C, Kostic V. Detection of Parkin (PARK2) and DJ1 (PARK7) mutations in early-onset Parkinson disease: Parkin mutation frequency depends on ethnic origin of patients. *Hum Mutat.* 2004;23(5):525.

- Djarmati A, Hedrich K, Svetel M, Lohnau T, Schwinger E, Romac S, Pramstaller PP, Kostić V, Klein C. Heterozygous PINK1 mutations: a susceptibility factor for Parkinson disease? *Mov Disord*. 2006;21(9):1526-30.
- Duan W, Zhu X, Ladenheim B, Yu QS, Guo Z, Oyler J, Cutler RG, Cadet JL, Greig NH, Mattson MP. p53 inhibitors preserve dopamine neurons and motor function in experimental parkinsonism. *Ann Neurol* 2002;52:597–606.
- Duda JE, Giasson BI, Mabon ME., Lee VM, Trojanowski JQ. Novel antibodies to synuclein show abundant striatal pathology in Lewy body diseases. *Ann Neurol* 2002;52:205–210.
- Dhungel N, Eleuteri S, Li LB, Kramer NJ, Chartron JW, Spencer B, Kosberg K, Fields JA, Stafa K, Adame A, Lashuel H, Frydman J, Shen K, Masliah E, Gitler AD. Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*. 2015;85(1):76-87.
- Eblan MJ, Walker JM, Sidransky E. The glucocerebrosidase gene and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2005;352: 728–731.
- Edvardson S, Cinnamon Y, Ta-Shma A, Shaag A, Yim YI, Zenvirt S, Jalas C, Lesage S, Brice A, Taraboulos A, Kaestner K H, Greene L E, Elpeleg O. A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrinuncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS One* 2012;7:e36458.
- Elbaz A and Tranchant C. Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2007; 262(1-2):37-44
- Elfferich P, Verleun-Mooijman MC, Maat-Kievit JA, van de Warrenburg BP, Abdo WF, Eshuis SA, Leenders KL, Hovestadt A, Zijlmans JC, Stroy JP, van Swieten JC, Boon AJ, van Engelen K, Verschuuren-Bemelmans CC, Lesnik-Oberstein SA, Tassorelli C, Lopiano L, Bonifati V, Dooijes D, van Minkelen R. Breakpoint mapping of 13 large parkin deletions/duplications reveals an exon 4 deletion and an exon 7 duplication as founder mutations. *Neurogenetics*. 2011;12(4):263-71.
- Esteves AR, Swerdlow RH, Cardoso SM. LRRK2, a puzzling protein: insights into Parkinson's disease pathogenesis. *Exp Neurol*. 2014;261:206-16.

- Fahn S, Elton R, Members of the updrs Development Committee. In: Fahn S, Marsden CD, Calne DB, Goldstein M, eds. *Recent Developments in Parkinson's Disease*, Vol 2. Florham Park, NJ. Macmillan Health Care Information 1987;153-163,293-304.
- Farrer M, Chan P, Chen R, Tan L, Lincoln S, Hernandez D, Forno L, Gwinn-Hardy K, Petrucelli L, Hussey J, Singleton A, Tanner C, Hardy J, Langston JW. Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* 2001;50(3):293–300.
- Farrer MJ, Williams LN, Algom AA, Kachergus J, Hulihan MM, Ross OA, Rajput A, Papapetropoulos S, Mash DC, Dickson DW. Glucosidase-beta variations and Lewy body disorders. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15: 414–416.
- Ferreira JJ, Guedes LC, Rosa MM, Coelho M, van Doeselaar M, Schweiger D, Di Fonzo A, Oostra BA, Sampaio C, Bonifati V. High prevalence of LRRK2 mutations in familial and sporadic Parkinson's disease in Portugal. *Mov Disord* 2007;22: 1194–1201.
- Ferree A, Guillily M, Li H, Smith K, Takashima A, Squillace R, Weigele M, Collins JJ, Wolozin B. Regulation of physiologic actions of LRRK2: focus on autophagy. *Neurodegener. Dis.* 2012; 10: 238–241.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res.* 1975;12(3):189-98.
- Foroud T, Uniacke SK, Liu L, Pankratz N, Rudolph A, Halter C, Shults C, Marder K, Conneally PM, Nichols WC; Parkinson Study Group. Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease. *Neurology.* 2003;60(5):796-801.
- Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Pappas N, Logan J, MacGregor R, Alexoff D, Shea C, Schlyer D, Wolf AP, Warner D, Zezulko I, Cilento R. Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. *Nature* 1996; 379(6567): 733-6.
- Fowler JS, Logan J, Wang GJ, Volkow ND. Monoamine oxidase and cigarette smoking. *Neurotoxicology* 2003;24(1):75-82.
- Fuchs J, Nilsson C, Kachergus J, Munz M, Larsson EM, Schüle B, Langston JW, Middleton FA, Ross OA, Hulihan M, Gasser T, Farrer MJ. Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology.* 2007.68(12):916-22.

- Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 2002;51(3):296–301.
- Funayama M, Hasegawa K, Ohta E, Kawashima N, Komiyama M, Kowa H, Tsuji S, Obata F. An LRRK2 mutation as a cause for the parkinsonism in the original PARK8 family. *Ann Neurol* 2005;57: 918–921.
- Fung HC, Chen CM, Hardy J, Hernandez D, Singleton A, Wu YR. Lack of G2019S LRRK2 mutation in a cohort of Taiwanese with sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006;21: 880–881.
- Gaig C, Ezquerra M, Marti MJ, Munoz E, Valldeoriola F, Tolosa E. LRRK2 mutations in Spanish patients with Parkinson disease: frequency, clinical features, and incomplete penetrance. *Arch Neurol* 2006;63: 377–382.
- Gandhi S, Wood-Kaczmar A, Yao Z, Plun-Favreau H, Deas E, Klupsch K, Downward J, Latchman DS, Tabrizi SJ, Wood NW, DuChen MR, Abramov AY. PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol Cell* 2009;33: 627–638.
- Gan-Or Z, Giladi N, Rozovski U, Shifrin C, Rosner S, Gurevich T, Bar-Shira A, Orr-Urtreger A. Genotype-phenotype correlations between *GBA* mutations and Parkinson disease risk and onset. *Neurology* 2008;70: 2277–2283.
- Gan-Or Z, Bar-Shira A, Mirelman A, Gurevich T, Kedmi M, Giladi N, Orr-Urtreger A. LRRK2 and *GBA* mutations differentially affect the initial presentation of Parkinson disease. *Neurogenetics* 2010;11(1):121-5.
- Gasser T. Mendelian forms of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(7):587-96.
- Gardet A, Benita Y, Li C, Sands BE, Ballester I, Stevens C, Korzenik JR, Rioux JD, Daly MJ, Xavier RJ, Podolsky DK. LRRK2 is involved in the IFN-gamma response and host response to pathogens. *J Immunol* 2010; 185:5577–85.
- Gibb, W.R. and A.J. Lees, The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51(6):745-52.

- Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA. Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 2012;20:490–7.
- Gillies GE, McArthur S. Independent influence of sex steroids of systemic and central origin in a rat model of Parkinson's disease: a contribution to sex-specific neuroprotection by estrogen. *Hormones and Behavior* 2010;57:23–34.
- Giordana MT, D'Agostino C, Albani G, Mauro A, Di Fonzo A, Antonini A, Bonifati V. Neuropathology of Parkinson's disease associated with the LRRK2 Ile1371Val mutation. *Mov Disord*. 2007;15;22(2):275-8.
- Gloeckner CJ, Schumacher A, Boldt K, Ueffing M. The Parkinson disease associated protein kinase LRRK2 exhibits MAPKKK activity and phosphorylates MKK3/6 and MKK4/7, in vitro. *J. Neurochem*. 2009; 109: 959–968.
- Goetz CG, Vogel C, Tanner CM, Stebbins GT. Early dopaminergic drug-induced hallucinations in parkinsonian patients. *Neurology* 1998;51(3):811-4. a
- Goetz CG, Pappert EJ, Blasucci LM, Stebbins GT, Ling ZD, Nora MV, Carvey PM. Intravenous levodopa in hallucinating Parkinson's disease patients: high-dose challenge does not precipitate hallucinations. *Neurology* 1998;50(2):515-7. b
- Goker-Alpan O, Giasson BI, Eblan MJ, Nguyen J, Hurtig HI, Lee VM, Trojanowski JQ, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations are an important risk factor for Lewy body disorders. *Neurology* 2006;67: 908–910.
- Golbe, L.I., T.M. Farrell, and P.H. Davis, Case-control study of early life dietary factors in Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1988;45(12): 1350-3.
- Goldberg MS, Fleming SM, Palacino JJ, Cepeda C, Lam HA, Bhatnagar A, Meloni EG, Wu N, Ackerson LC, Klapstein GJ, Gajendiran M, Roth BL, Chesselet MF, Maidment NT, Levine MS, Shen J. Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *J Biol Chem* 2003;278(44):43628–43635.
- Gonzalez-Fernandez MC, Lezcano E, Ross OA, Gomez-Esteban JC, Gomez-Busto F, Velasco F, Alvarez-Alvarez M, Rodriguez-Martinez MB, Ciordia R, Zarranz JJ, Farrer MJ, Mata IF, de Pancorbo MM. Lrrk2-associated parkinsonism is a major cause of disease in Northern Spain. *Parkinsonism Relat Disord* 2007;13: 509–515.

- Gorostidi A, Ruiz-Martinez J, Lopez de Munain A, Alzualde A, Masso JF. LRRK2 G2019S and R1441G mutations associated with Parkinson's disease are common in the Basque Country, but relative prevalence is determined by ethnicity. *Neurogenetics* 2009;10: 157–159.
- Gouider-Khouja N, Larnaout A, Amouri R, Sfar S, Belal S, Ben Hamida C, Ben Hamida M, Hattori N, Mizuno Y, Hentati F. Autosomal recessive parkinsonism linked to parkin gene in a Tunisian family. Clinical, genetic and pathological study. *Parkinsonism Relat Disord.* 2003;9(5):247-51.
- Grandinetti A, Morens DM, Reed D, MacEachern D. Prospective study of cigarette smoking and the risk of developing idiopathic Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 1994;139(12): 1129-38.
- Greenamyre, J.T. and T.G. Hastings, *Biomedicine*. Parkinson's--divergent cause convergent mechanisms. *Science* 2004;304(5674): 1120-2.
- Greggio E, Zambrano I, Kaganovich A, Beilina A, Taymans JM, Daniels V, Lewis P, Jain S, Ding J, Syed A, Thomas KJ, Baekelandt V, Cookson MR. The Parkinson disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) is a dimer that undergoes intramolecular autophosphorylation. *J Biol Chem* 2008;283: 16906–16914.
- Gu WJ, Corti O, Araujo F, Hampe C, Jacquier S, Lücking CB, Abbas N, Duyckaerts C, Rooney T, Pradier L, Ruberg M, Brice A. The C289G and C418R missense mutations cause rapid sequestration of human Parkin into insoluble aggregates. *Neurobiol Dis* 2003;14(3):357–364.
- Guerreiro PS, Huang Y, Gysbers A, Cheng D, Gai WP, Outeiro TF, Halliday GM. LRRK2 interactions with alpha-synuclein in Parkinson's disease brains and in cell models. *J. Mol. Med. (Berl)* 2012; 91(4): 513–522.
- Guo L, Gandhi PN, Wang W, Petersen RB, Wilson-Delfosse AL, Chen SG. The Parkinson's disease-associated protein, leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2), is an authentic GTPase that stimulates kinase activity. *Exp Cell Res* 2007;313: 3658–3670.
- Guo JF, Xiao B, Liao B, Zhang XW, Nie LL, Zhang YH, Shen L, Jiang H, Xia K, Pan Q, Yan XX, Tang BS. Mutation analysis of Parkin, PINK1, DJ-1 and ATP13A2 genes in



- Chinese patients with autosomal recessive early-onset Parkinsonism. *Mov Disord*. 2008;23(14):2074-9.
- Hague S, Rogaeva E, Hernandez D, Gulick C, Singleton A, Hanson M, Johnson J, Weiser R, Gallardo M, Ravina B, Gwinn-Hardy K, Crawley A, St George-Hyslop PH, Lang AE, Heutink P, Bonifati V, Hardy J, Singleton A. Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Ann Neurol* 2003;54(2):271–274.
- Hagenah JM, König IR, Becker B, Hilker R, Kasten M, Hedrich K, Pramstaller PP, Klein C, Seidel G. Substantia nigra hyperechogenicity correlates with clinical status and number of Parkin mutated alleles. *J Neurol* 2007; 254: 1407–1413.
- Hagenah JM, Becker B, Brüggemann N, Djarmati A, Lohmann K, Sprenger A, Klein C, Seidel G. Transcranial sonography findings in a large family with homozygous and heterozygous PINK1 mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79(9):1071-4.
- Hamilton M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1960;23:56-62.
- Hamilton M. Diagnosis and rating of anxiety. *British Journal of Medical Psychology* 1969;3:76-79.
- Haugarvoll K, Rademakers R, Kachergus JM, Nuytemans K, Ross OA, Gibson JM, Tan EK, Gaig C, Tolosa E, Goldwurm S, Guidi M, Riboldazzi G, Brown L, Walter U, Benecke R, Berg D, Gasser T, Theuns J, Pals P, Cras P, De Deyn PP, Engelborghs S, Pickut B, Uitti RJ, Foroud T, Nichols WC, Hagenah J, Klein C, Samii A, Zabetian CP, Bonifati V, Van Broeckhoven C, Farrer MJ, Wszolek ZK. Lrrk2 R1441C parkinsonism is clinically similar to sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2008;70(16 pt 2):1456–1460.
- Hatano T, Kubo S, Imai S, Maeda M, Ishikawa K, Mizuno Y, Hattori N. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Hum Mol Genet* 2007;16(6):678–690.
- Hatano Y, Sato K, Elibol B, Yoshino H, Yamamura Y, Bonifati V, Shinotoh H, Asahina M, Kobayashi S, Ng AR, Rosales RL, Hassin-Baer S, Shinar Y, Lu CS, Chang HC, Wu-Chou YH, Ataç FB, Kobayashi T, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology* 2004;63(8):1482–1485.

- Hattori N, Matsumine H, Asakawa S, Kitada T, Yoshino H, Elibol B, Brookes AJ, Yamamura Y, Kobayashi T, Wang M, Yoritaka A, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y. Point mutations (Thr240Arg and Gln311Stop) [correction of Thr240Arg and Ala311Stop] in the Parkin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249(3):754–758.
- Haywood AF, Staveley BE. Mutant alpha-synuclein-induced degeneration is reduced by parkin in a fly model of Parkinson's disease. *Genome* 2006; 49: 505–510.
- Hawkes, C.H., B.C. Shephard, and S.E. Daniel, Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62(5): 436-46.
- Healy DG, Abou-Sleiman PM, Gibson JM, Ross OA, Jain S, Gandhi S, Gosal D, Muqit MM, Wood NW, Lynch T. PINK1 (PARK6) associated Parkinson disease in Ireland. *Neurology* 2004;63(8):1486–1488
- Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK, Berciano J, Schapira AH, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ, Wood NW. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 2008;7: 583– 590.
- Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouze P, Brunak S. Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Research* 1996; 24(17): 3439-3452.
- Hedrich K, Marder K, Harris J, Kann M, Lynch T, Meija-Santana H, Pramstaller PP, Schwinger E, Bressman SB, Fahn S, Klein C. Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for Parkin mutations. *Neurology* 2002;58(8):1239–1246.
- Hedrich K, Eskelson C, Wilmot B, Marder K, Harris J, Garrels J, Meija-Santana H, Vieregge P, Jacobs H, Bressman SB, Lang AE, Kann M, Abbruzzese G, Martinelli P, Schwinger E, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C, Kramer P. Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies. *Mov Disord* 2004;19(10):1146–1157.

- Hedrich K, Winkler S, Hagenah J, Kabakci K, Kasten M, Schwinger E, Volkmann J, Pramstaller PP, Kostic V, Vieregge P, Klein C. Recurrent LRRK2 (Park8) mutations in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2006;21(9):1506-10.
- Hellenbrand W, Boeing H, Robra BP, Seidler A, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Schneider E, Ulm G. Diet and Parkinson's disease II: a possible role for the past intake of specific nutrients. Results from a self-administered food-frequency questionnaire in a case control study. *Neurology* 1996;47(3):644-50.
- Hering R, Strauss KM, Tao X, Bauer A, Voitalla D, Mietz EM, Petrovic S, Bauer P, Schaible W, Muller T, Schols L, Klein C, Berg D, Meyer PT, Schulz JB, Wollnik B, Tong L, Kruger R, Riess O. Novel homozygous p.E64D mutation in DJ1 in early onset Parkinson disease (PARK7). *Hum Mutat* 2004;24(4):321–329.
- Hernán MA, Zhang SM, Rueda-deCastro AM, Colditz GA, Speizer FE, Ascherio A. Cigarette smoking and the incidence of Parkinson's disease in two prospective studies. *Ann Neurol* 2001;50(6): 780-6.
- Hierro A, Rojas AL, Rojas R, Murthy N, Effantin G, Kajava AV, Steven AC, Bonifacino JS, Hurley JH . Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature* 2007; 449 (7165): 1063–1067.
- Hilker R, Klein C, Hedrich K, Ozelius LJ, Vieregge P, Herholz K, Pramstaller PP, Heiss WD. The striatal dopaminergic deficit is dependent on the number of mutant alleles in a family with mutations in the parkin gene: evidence for enzymatic parkin function in humans. *Neurosci Lett* 2002;323: 50–54.
- Hobson DE, Lang AE, Martin WR, Razmy A, Rivest J, Fleming J. Excessive daytime sleepiness and sudden-onset sleep in Parkinson disease: a survey by the Canadian Movement Disorders Group. *JAMA* 2002;287(4):455-63.
- Hoehn MM and Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967; 17(5): 427-42.
- Hoenicka J, Vidal L, Morales B, Ampuero I, Jiménez-Jiménez FJ, Berciano J, del Ser T, Jiménez A, Ruiz PG, de Yébenes JG. Molecular findings in familial Parkinson disease in Spain. *Arch Neurol*. 2002;59(6):966-70.

- Holdorff B, Rodrigues e Silva AM, Dodel R. Centenary of Lewy bodies (1912-2012). *J Neural Transm.* 2013;120(4):509-16.
- Hornykiewicz O. A brief history of levodopa. *J Neurol.* 2010;257(2):S249-52.
- Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (*GBA*). *Hum Mutat* 2008;29: 567–583.
- 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.
- Illarioshkin SN, Periquet M, Rawal N, Lücking CB, Zagorovskaya TB, Slominsky PA, Miloserdova OV, Markova ED, Limborska SA, Ivanova-Smolenskaya IA, Brice A. Mutation analysis of the parkin gene in Russian families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Mov Disord.* 2003;18(8):914-9.
- Imai Y, Gehrke S, Wang HQ, Takahashi R, Hasegawa K, Oota E, Lu B. Phosphorylation of 4E-BP by LRRK2 affects the maintenance of dopaminergic neurons in *Drosophila*. *EMBO J* 2008;27: 2432–2443.
- Infante J, Rodriguez E, Combarros O, Mateo I, Fontalba A, Pascual J, Oterino A, Polo JM, Leno C, Berciano J. LRRK2 G2019S is a common mutation in Spanish patients with late-onset Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2006;395: 224–226.
- Itier JM, Ibanez P, Mena MA, Abbas N, Cohen-Salmon C, Bohme GA, Laville M, Pratt J, Corti O, Pradier L, Ret G, Joubert C, Periquet M, Araujo F, Negroni J, Casarejos MJ, Canals S, Solano R, Serrano A, Gallego E, Sanchez M, Deneffe P, Benavides J, Tremp G, Rooney TA, Brice A, Garcia dY. Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Hum Mol Genet* 2003;12(18):2277–2291.
- Ito G, Okai T, Fujino G, Takeda K, Ichijo H, Katada T, Iwatsubo T. GTP binding is essential to the protein kinase activity of LRRK2, a causative gene product for familial Parkinson's disease. *Biochemistry* 2007;46(5):1380–1388.
- Ishihara L, Warren L, Gibson R, Amouri R, Lesage S, Durr A, Tazir M, Wszolek ZK, Uitti RJ, Nichols WC, Griffith A, Hattori N, Leppert D, Watts R, Zabetian CP, Foroud TM, Farrer MJ, Brice A, Middleton L, Hentati F. Clinical features of Parkinson disease

- patients with homozygous leucine-rich repeat kinase 2 G2019S mutations. *Arch Neurol* 2006;63: 1250–1254.
- Jaleel M, Nichols RJ, Deak M, Campbell DG, Gillardon F, Knebel A, Alessi DR. LRRK2 phosphorylates moesin at threonine-558: characterization of how Parkinson's disease mutants affect kinase activity. *J Biol Chem* 2007; 405: 307–317.
- Jankovic J, Searching for a relationship between manganese and welding and Parkinson's disease. *Neurology* 2005; 64(12):2021-8.
- Johnson CC, Gorell JM, Rybicki BA, Sanders K, Peterson EL. Adult nutrient intake as a risk factor for Parkinson's disease. *Int J Epidemiol* 1999; 28(6):1102-9.
- Johnson J, Paisan-Ruiz C, Lopez G, Crews C, Britton A, Malkani R, Evans EW, McInerney-Leo A, Jain S, Nussbaum RL, Foote KD, Mandel RJ, Crawley A, Reimsnider S, Fernandez HH, Okun MS, Gwinn-Hardy K, Singleton AB. Comprehensive screening of a North American Parkinson's disease cohort for LRRK2 mutation. *Neurodegenerative Dis* 2007; 4: 386–391.
- Jones AC, Yamamura Y, Almasy L, Bohlega S, Elibol B, Hubble J, Kuzuhara S, Uchida M, Yanagi T, Weeks DE, Nygaard TG. Autosomal recessive juvenile parkinsonism maps to 6q25.2-q27 in four ethnic groups: detailed genetic mapping of the linked region. *Am J Hum Genet* 1998;63(1):80–87.
- Kabuta T, Furuta A, Aoki S, Furuta K, Wada K. Aberrant interaction between Parkinson disease-associated mutant UCH-L1 and the lysosomal receptor for chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem*. 2008;283(35):23731-8.
- Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Paisan-Ruiz C, Katsarou Z, Hardy J, Fidani L. Complete screening for glucocerebrosidase mutations in Parkinson disease patients from Greece. *Neurosci Lett* 2009;452(2):87-9.
- Kann M, Jacobs H, Mohrmann K, Schumacher K, Hedrich K, Garrels J, Wiegers K, Schwinger E, Pramstaller PP, Breakefield XO, Ozelius LJ, Vieregge P, Klein C. Role of parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2002;51(5):621–625.
- Kay DM, Moran D, Moses L, Poorkaj P, Zabetian CP, Nutt J, Factor SA, Yu CE, Montimurro JS, Keefe RG, Schellenberg GD, Payami H. Heterozygous parkin point

- mutations are as common in control subjects as in Parkinson's patients. *Ann Neurol* 2007; 61:47–54.
- Kay DM, Stevens CF, Hamza TH, Montimurro JS, Zabetian CP, Factor SA, Samii A, Griffith A, Roberts JW, Molho ES, Higgins DS, Gancher S, Moses L, Zarepari S, Poorkaj P, Bird T, Nutt J, Schellenberg GD, Payami H. A comprehensive analysis of deletions, multiplications, and copy number variations in PARK2. *Neurology* 2010;75:1189–1194.
- Keller MF, Saad M, Bras J, Bettella F, Nicolaou N, Simón-Sánchez J, Mittag F, Büchel F, Sharma M, Gibbs JR, Schulte C, Moskvina V, Durr A, Holmans P, Kilarski LL, Guerreiro R, Hernandez DG, Brice A, Ylikotila P, Stefánsson H, Majamaa K, Morris HR, Williams N, Gasser T, Heutink P, Wood NW, Hardy J, Martinez M, Singleton AB, Nalls MA; International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC); Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2). Using genome-wide complex trait analysis to quantify 'missing heritability' in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2012;21(22):4996-5009.
- Khan NL, Valente EM, Bentivoglio AR, Wood NW, Albanese A, Brooks DJ, Piccini P. Clinical and subclinical dopaminergic dysfunction in PARK6-linked parkinsonism: an 18F-dopa PET study. *Ann Neurol* 2002;52(6):849–853.
- Khan NL, Scherfler C, Graham E, Bhatia KP, Quinn N, Lees AJ, Brooks DJ, Wood NW, Piccini P. Dopaminergic dysfunction in unrelated, asymptomatic carriers of a single parkin mutation. *Neurology* 2005;64(1):134–136.
- Khan NL, Jain S, Lynch JM, Pavese N, Abou-Sleiman P, Holton JL, Healy DG, Gilks WP, Sweeney MG, Ganguly M, Gibbons V, Gandhi S, Vaughan J, Eunson LH, Katzenschlager R, Gayton J, Lennox G, Revesz T, Nicholl D, Bhatia KP, Quinn N, Brooks D, Lees AJ, Davis MB, Piccini P, Singleton AB, Wood NW. Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain* 2005;128: 2786–2796.

- Kim SJ, Sung JY, Um JW, Hattori N, Mizuno Y, Tanaka K, Paik SR, Kim J, Chung KC. Parkin cleaves intracellular alpha-synuclein inclusions via the activation of calpain. *J Biol Chem* 2003;278: 41890–41899.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392(6676):605–608.
- Klein C, Pramstaller PP, Kis B, Page CC, Kann M, Leung J, Woodward H, Castellan CC, Scherer M, Vieregge P, Breakefield XO, Kramer PL, Ozelius LJ. Parkin deletions in a family with adult-onset, tremordominant parkinsonism: expanding the phenotype. *Ann Neurol* 2000;48(1):65–71.
- Klein C, Hedrich K, Wellenbrock C, Kann M, Harris J, Marder K, Lang AE, Schwinger E, Ozelius LJ, Vieregge P, Pramstaller PP, Kramer PL. Frequency of parkin mutations in late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;54(3):415–416. author reply 416-417.
- Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, Schlossmacher MG, Lang AE. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol* 2007; 6:652–662.
- Klein C, Schlossmacher MG. The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol* 2006;2: 136–146.
- Klein C, Chuang R, Marras C, Lang AE. The curious case of phenocopies in families with genetic Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2011;26(10):1793-802.
- Klein C and Westenberger A. Genetics of Parkinson's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2(1): a008888.
- Krebs CE, Karkheiran S, Powell JC, Cao M, Makarov V, Darvish H, Di Paolo G, Walker R H, Shahidi G A, Buxbaum J D, De Camilli P, Yue Z, Paisan-Ruiz C. The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive parkinsonism with generalized seizures. *Hum Mutat* 2013;34:1200–7.
- Kresojević N, Mijajlović M, Perić S, Pavlović A, Svetel M, Janković M, Dobričić V, Novaković I, Lakočević MB, Klein C, Kostić VS. Transcranial sonography in patients with Parkinson's disease with glucocerebrosidase mutations. *Parkinsonism Relat Disord*. 2013;19(4):431-5.

- Kobayashi H, Kruger R, Markopoulou K, Wszolek Z, Chase B, Taka H, Mineki R, Murayama K, Riess O, Mizuno Y, Hattori N. Haploinsufficiency at the alpha-synuclein gene underlies phenotypic severity in familial Parkinson's disease. *Brain* 2003;126: 32–42.
- Kono S, Shirakawa K, Ouchi Y, Sakamoto M, Ida H, Sugiura T, Tomiyama H, Suzuki H, Takahashi Y, Miyajima H, Hattori N, Mizuno Y. Dopaminergic neuronal dysfunction associated with parkinsonism in both a Gaucher disease patient and a carrier. *J Neurol Sci* 2007;252: 181–184.
- Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 2008;3(9):1452-6.
- Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 2007; 23(10):1289-91.
- Koroglu C, Baysal L, Cetinkaya M, Karasoy H, Tolun A. DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability. *Parkinsonism Relat Disord* 2013;19:320–4.
- Kostić VS. Parkinsonova bolest i parkinsonizam. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu-CIBIF, 1998.
- Kostić VS, Marinković J, Svetel M, Stefanova E, Przedborski S. The effect of stage of Parkinson's disease at the onset of levodopa therapy on development of motor complications. *Eur J Neurol*. 2002;9(1):9-14.
- Kostić VS. Treatment of young-onset Parkinson's disease: role of dopamine receptor agonists. *Parkinsonism Relat Disord*. 2009;15 Suppl 4:S71-5.
- Kostić VS, Pekmezović T, Tomić A, Jecmenica-Lukić M, Stojković T, Spica V, Svetel M, Stefanova E, Petrović I, Dzoljić E. Suicide and suicidal ideation in Parkinson's disease. *J Neurol Sci*. 2010;289(1-2):40-3.
- Koziorowski D, Hoffman-Zacharska D, Sławek J, Szirkowiec W, Janik P, Bal J, Friedman A. Low frequency of the PARK2 gene mutations in Polish patients with the early-onset form of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2010;16(2):136-8.



- Kubo SI, Kitami T, Noda S, Shimura H, Uchiyama Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y, Hattori N. Parkin is associated with cellular vesicles. *J Neurochem* 2001;78(1):42–54.
- Kumar KR, Weissbach A, Heldmann M, Kasten M, Tunc S, Sue CM, Svetel M, Kostić VS, Segura-Aguilar J, Ramirez A, Simon DK, Vieregge P, Münte TF, Hagenah J, Klein C, Lohmann K. Frequency of the D620N mutation in VPS35 in Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2012;69(10):1360-4.
- Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, Shono M, Akaike M, Azuma H, Matsumoto T. Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum Mol Genet* 2006;15: 883–895.
- Lai BC, Marion SA, Teschke K, Tsui JK. Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2002; 8(5):297-309.
- Lang AE and Lozano AM. parkinsons disease. *N Engl J Med* 1998;339(15):1044-1053.
- Langston JW and Ballard PA. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6- tetrahydrophytidine. *N Engl J Med* 1983;309(5):310.
- Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6- tetrahydrophytidine exposure. *Ann neurol* 1999; 46(4):598-605.
- Lesage S, Patin E, Condroyer C, Leutenegger AL, Lohmann E, Giladi N, Bar-Shira A, Belarbi S, Hecham N, Pollak P, Ouvrard-Hernandez AM, Bardien S, Carr J, Benhassine T, Tomiyama H, Pirkevi C, Hamadouche T, Cazeneuve C, Basak AN, Hattori N, Durr A, Tazir M, Orr-Urtreger A, Quintana-Murci L, Brice A. Parkinson's disease-related LRRK2 G2019S mutation results from independent mutational events in humans. *Hum Mol Genet* 2004;19: 1998.
- Lesage S, Dürr A, Tazir M, Lohmann E, Leutenegger AL, Janin S, Pollak P, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med* 2006;354(4):422–423.
- Lesage S, Lohmann E, Tison F, Durif F, Durr A, Brice A. Rare heterozygous parkin variants in French early-onset Parkinson disease patients and controls. *J Med Genet* 2008;45(1):43–46.

- Lesage S, Belarbi S, Troiano A, Condroyer C, Hecham N, Pollak P, Lohman E, Benhassine T, Ysmail-Dahlouk F, Durr A, Tazir M, Brice A. Is the common LRRK2 G2019S mutation related to dyskinesias in North African Parkinson disease? *Neurology* 2008;71: 1550–1552. b
- Lesage S, Condroyer C, Lannuzel A, Lohmann E, Troiano A, Tison F, Damier P, Thobois S, Ouvrard-Hernandez AM, Rivaud-Pechoux S, Brefel-Courbon C, Destee A, Tranchant C, Romana M, Leclere L, Durr A, Brice A. Molecular analyses of the LRRK2 gene in European and North African autosomal dominant Parkinson's disease. *J Med Genet* 2009;46: 458–464.
- Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Gene* 2009;18(R1):R48-59.
- Lesage S, Anheim M, Condroyer C, Pollak P, Durif F, Dupuits C, Viallet F, Lohmann E, Corvol JC, Honoré A, Rivaud S, Vidailhet M, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2011;20(1):202-10. a
- Lesage S, Condroyer C, Hecham N, Anheim M, Belarbi S, Lohman E, Viallet F, Pollak P, Abada M, Durr A, Tazir M, Brice A. Mutations in the glucocerebrosidase gene confer a risk for Parkinson disease in North Africa. *Neurology* 2011;76: 301–303. b
- Lesage S, Condroyer C, Klebe S, Honoré A, Tison F, Brefel-Courbon C, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Identification of VPS35 mutations replicated in French families with Parkinson disease. *Neurology* 2012;78:1449–1450.
- Lewy FH. Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde.* 1913. 50: 50-55.
- Li Y, Tomiyama H, Sato K, Hatano Y, Yoshino H, Atsumi M, Kitaguchi M, Sasaki S, Kawaguchi S, Miyajima H, Toda T, Mizuno Y, Hattori N. Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Neurology* 2005;64(11):1955–1957.

- Lichtenberg M, Mansilla A, Zecchini VR, Fleming A, Rubinsztein DC. The Parkinson's disease protein LRRK2 impairs proteasome substrate clearance without affecting proteasome catalytic activity. *Cell Death Dis.* 2011; 2: e196.
- Lin X, Parisiadou L, Gu XL, Wang L, Shim H, Sun L, Xie C, Long CX, Yang WJ, Ding J, Chen ZZ, Gallant PE, Tao-Cheng JH, Rudow G, Troncoso JC, Liu Z, Li Z, Cai H. Leucine-rich repeat kinase 2 regulates the progression of neuropathology induced by Parkinson's-disease-related mutant alpha-synuclein. *Neuron* 2009;64(6):807–827.
- Lincoln SJ, Maraganore DM, Lesnick TG, Bounds R, de Andrade M, Bower JH, Hardy JA, Farrer MJ. Parkin variants in North American Parkinson's disease: cases and controls. *Mov Disord* 2003;18: 1306–1311.
- Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, Mooney SD, Radivojac P. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics.* 2009;25(21):2744-50.
- Liou AK, Leak RK, Li L, Zigmond MJ. Wild-type LRRK2 but not its mutant attenuates stress-induced cell death via ERK pathway. *Neurobiol. Dis.* 2008;32: 116–124.
- Liu M, Dobson B, Glicksman MA, Yue Z, Stein RL. Kinetic mechanistic studies of wild-type leucine-rich repeat kinase 2: characterization of the kinase and GTPase activities. *Biochemistry* 2010; 49: 2008–2017.
- Lo Bianco C, Schneider BL, Bauer M, Sajadi A, Brice A, Iwatsubo T, Aebischer P. Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an alphasynuclein rat model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101: 17510–17515.
- Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(20):11364–11369.
- Lu CS, Simons EJ, Wu-Chou YH, Fonzo AD, Chang HC, Chen RS, Weng YH, Rohe CF, Breedveld GJ, Hattori N, Gasser T, Oostra BA, Bonifati V. The LRRK2 I2012T, G2019S, and I2020T mutations are rare in Taiwanese patients with sporadic Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2005;11: 521–522.

- Lucking CB, Bonifati V, Periquet M, Vanacore N, Brice A, Meo G. Pseudo-dominant inheritance and exon 2 triplication in a family with parkin gene mutations. *Neurology* 2001;57: 924–927.
- Lwin A, Orvisky E, Goker-Alpan O, LaMarca ME, Sidransky E. Glucocerebrosidase mutations in subjects with parkinsonism. *Mol Genet Metab*. 2004;81(1):70-3.
- Machida Y, Chiba T, Takayanagi A, Tanaka Y, Asanuma M, Ogawa N, Koyama A, Iwatsubo T, Ito S, Jansen PH, Shimizu N, Tanaka K, Mizuno Y, Hattori N. Common anti-apoptotic roles of parkin and alpha-synuclein in human dopaminergic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332(1):233–240.
- Magalhães M, Wenning GK, Daniel SE, Quinn NP. Autonomic dysfunction in pathologically confirmed multiple system atrophy and idiopathic Parkinson's disease--a retrospective comparison. *Acta Neurol Scand*. 1995 Feb;91(2):98-102.
- Malgieri G, Eliezer D. Structural effects of Parkinson's disease linked DJ-1 mutations. *Protein Sci* 2008;17(5):855–868.
- Malini E, Grossi S, Deganuto M, Rosano C, Parini R, Dominisini S, Cariati R, Zampieri S, Bembi B, Filocamo M, Dardis A. Functional analysis of 11 novel *GBA* alleles. *Eur J Hum Genet*. 2014;22(4):511-6.
- Manickam M, Ramanan P, Singh P, Talwar P. In silico identification of genetic variants in glucocerebrosidase (*GBA*) gene involved in Gaucher's disease using multiple software tools. *Front Genet* 2014;5:148.
- Marder K. Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2010;25 Suppl 1:S110-6.
- Marongiu R, Ghezzi D, Ialongo T, Soleti F, Elia A, Cavone S, Albanese A, Altavista MC, Barone P, Brusa L, Cortelli P, Petrozzi L, Scaglione C, Stanzione P, Tinazzi M, Zeviani M, Dallapiccola B, Bentivoglio AR, Valente EM, Garavaglia B. Frequency and phenotypes of LRRK2 G2019S mutation in Italian patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006;21: 1232–1235.
- Marras C., Schüle B., Munhoz R.P., Rogaeva E., Langston J.W., Kasten M. Phenotype in parkinsonian and nonparkinsonian LRRK2 G2019S mutation carriers. *Neurology*. 2011;77:325–333.

- Maruyama M, Ikeuchi T, Saito M, Ishikawa A, Yuasa T, Tanaka H, Hayashi S, Wakabayashi K, Takahashi H, Tsuji S. Novel mutations, pseudo-dominant inheritance, possible familial affects in patients with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Ann Neurol* 48: 245–250, 2000.
- Mata IF, Kachergus JM, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Lynch T, Hulihan MM, Cobb SA, Wu RM, Lu CS, Lahoz C, Wszolek ZK, Farrer MJ. Lrrk2 pathogenic substitutions in Parkinson's disease. *Neurogenetics* 2005; 6: 171–177.
- Mata IF, Wedemeyer WJ, Farrer MJ, Taylor JP, Gallo KA. LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci* 2006;29: 286–293.a
- Mata IF, Ross OA, Kachergus J, Huerta C, Ribacoba R, Moris G, Blazquez M, Guisasola LM, Salvador C, Martinez C, Farrer M, Alvarez V. LRRK2 mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain. *Eur J Neurol* 2006;13(4):391–394. b
- Mata IF, Samii A, Schneer SH, Roberts JW, Griffith A, Leis BC, Schellenberg GD, Sidransky E, Bird TD, Leverenz JB, Tsuang D, Zabetian CP. Glucocerebrosidase gene mutations: a risk factor for Lewy body disorders. *Arch Neurol* 2008;65: 379–382.
- Mata IF, Hutter CM, Gonzalez-Fernandez MC, de Pancorbo MM, Lezcano E, Huerta C, Blazquez M, Ribacoba R, Guisasola LM, Salvador C, Gomez-Esteban JC, Zarranz JJ, Infante J, Jankovic J, Deng H, Edwards KL, Alvarez V, Zabetian CP. Lrrk2 R1441G-related Parkinson's disease: evidence of a common founding event in the seventh century in Northern Spain. *Neurogenetics* 2009;10: 347–353.
- Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y, Yokochi M, Kobayashi T, Igarashi S, Takano H, Sanpei K, Koike R, Mori H, Kondo T, Mizutani Y, Schäffer AA, Yamamura Y, Nakamura S, Kuzuhara S, Tsuji S, Mizuno Y. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* 1997;60(3): 588–596.
- Menza MA, Golbe LI, Cody RA, Forman NE. Dopamine-related personality traits in Parkinson's disease. *Neurology* 1993; 43(3):505-8.
- Metzker ML. Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet* 2010;11:31–46.

- Michelakakis H, Moraitou M, Dimitriou E, Santamaria R, Sanchez G, Gort L, Chabas A, Grinberg D, Dassopoulou M, Fotopoulos S, Vilageliu L. Homozygosity for the double D409H+H255Q allele in type II Gaucher disease. *J Inher Metab Dis*. 2006;29(4):591.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
- Moller JC, Rissling I, Mylius V, Hoft C, Eggert KM, Oertel WH. The prevalence of the G2019S and R1441C/G/H mutations in LRRK2 in German patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2008;15: 743–745.
- Montfort M, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D. Functional analysis of 13 *GBA* mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and "modifier" polymorphisms. *Hum Mutat* 2004;23(6):567-75.
- Moody DE and Hammock BD. The effect of tridiphane (2-(3,5-dichlorophenyl)-2-(2,2,2-trichloroethyl)oxirane) on hepatic epoxide-metabolizing enzymes: indications of peroxisome proliferation. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987; 89(1): 37-48.
- Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL. Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet* 2005;14(1):71-84.
- Mori H, Kondo T, Yokochi M, Matsumine H, Nakagawa-Hattori Y, Miyake T, Suda K, Mizuno Y. Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 1998;51(3):890–892.
- Mortiboys H, Thomas KJ, Koopman WJ, Klaffke S, Abou-Sleiman P, Olpin S, Wood NW, Willems PH, Smeitink JA, Cookson MR, Bandmann O. Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Ann Neurol* 2008;64: 555–565.
- Mouatt-Prigent A, Muriel MP, Gu WJ, El Hachimi KH, Lücking CB, Brice A, Hirsch EC. Ultrastructural localization of parkin in the rat brainstem, thalamus and basal ganglia. *J Neural Transm* 2004;111(10-11):1209–1218.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.

- Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Arigo SM, Ariga H. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231(2):509–513.
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008;183: 795–803.
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin-induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease. *Autophagy* 2009; 5.
- Nègre-Pagès L, Regragui W, Bouhassira D, Grandjean H, Rascol O; DoPaMiP Study Group. Chronic pain in Parkinson's disease: the cross-sectional French DoPaMiP survey. *Mov Disord.* 2008. 23(10):1361-9.
- Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, Li A, Holton J, Guerreiro R, Paudel R, Segarane B, Singleton A, Lees A, Hardy J, Houlden H, Revesz T, Wood NW. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain* 2009;132: 1783–1794.
- Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 2001;11(5):863-74.
- Ng CH, Mok SZ, Koh C, Ouyang X, Fivaz ML, Tan EK, Dawson VL, Dawson TM, Yu F, Lim KL. Parkin protects against LRRK2 G2019S mutant-induced dopaminergic neurodegeneration in *Drosophila*. *J. Neurosci.*2009; 29: 11257–11262.
- Nichols WC, Elsaesser VE, Pankratz N, Pauciulo MW, Marek DK, Halter CA, Rudolph A, Shults CW, Foroud T. LRRK2 mutation analysis in Parkinson disease families with evidence of linkage to PARK8. *Neurology* 2007;69: 1737–1744.
- Nichols WC, Pankratz N, Marek DK, Pauciulo MW, Elsaesser VE, Halter CA, Rudolph A, Wojcieszek J, Pfeiffer RF, Foroud T. Mutations in *GBA* are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology* 2009;72: 310–316.
- Nuytemans K, Meeus B, Crosiers D, Brouwers N, Goossens D, Engelborghs S, Pals P, Pickut B, Van den Broeck M, Corsmit E, Cras P, De Deyn PP, Del-Favero J, Van Broeckhoven C, Theuns J. Relative contribution of simple mutations vs. copy number variations in five Parkinson disease genes in the Belgian population. *Hum Mutat* 2009;30: 1054–1061.

- Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat* 2010; 31: 763–780.
- Ohta E, Hasegawa K, Gasser T, Obata F. Independent occurrence of I2020T mutation in the kinase domain of the leucine rich repeat kinase 2 gene in Japanese and German Parkinson's disease families. *Neurosci Lett* 2007;417: 21–23.
- Okubadejo N, Britton A, Crews C, Akinyemi R, Hardy J, Singleton A, Bras J. Analysis of Nigerians with apparently sporadic Parkinson disease for mutations in LRRK2, PRKN and ATXN3. *PloS One* 2008;3: e3421.
- Olanow CW. Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology*. 1990;40(10 Suppl 3): 32-37.
- Oliveri RL, Zappia M, Annesi G, Annesi F, Spadafora P, Pasqua AA, Tomaino C, Nicoletti G, Bosco D, Messina D, Logroscino G, Manobianca G, Epifanio A, Morgante L, Savettieri G, Quattrone A. The parkin gene is not a major susceptibility locus for typical late-onset Parkinson's disease. *Neurol Sci* 2001;22(1):73–74.
- Orr-Urtreger A, Shifrin C, Rozovski U, Rosner S, Bercovich D, Gurevich T, Yagev- More H, Bar-Shira A, Giladi N. The LRRK2 G2019S mutation in Ashkenazi Jews with Parkinson disease: is there a gender effect? *Neurology* 2007;69(16):1595–1602.
- Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, Ohmann E, Deligtisch A, Tagliati M, Hunt AL, Klein C, Henick B, Hailpern SM, Lipton RB, Soto-Valencia J, Risch N, Bressman SB. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2006;354(4):424–425.
- Paganini-Hill A. Risk factors for parkinson's disease: the leisure world cohort study. *Neuroepidemiology* 2001;20(2): 118-24.
- Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, van der Brug M, López de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Martí-Massó JF, Pérez-Tur J, Wood NW, Singleton AB. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004;44(4):595–600.



- Paisán-Ruíz C, Lang AE, Kawarai T, Sato C, Salehi-Rad S, Fisman GK, Al-Khairallah T, St George-Hyslop P, Singleton A, Rogaeva E. LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study. *Neurology* 2005;65(5):696-700.
- Paisan-Ruiz C, Nath P, Washecka N, Gibbs JR, Singleton AB. Comprehensive analysis of LRRK2 in publicly available Parkinson's disease cases and neurologically normal controls. *Hum Mutat* 2008;29: 485–490.
- Paisan-Ruiz C, Washecka N, Nath P, Singleton AB, Corder EH. Parkinson's disease and low frequency alleles found together throughout LRRK2. *Ann Hum Genet* 2009;73: 391–403.
- Paisán-Ruiz C, Li A, Schneider SA, Holton JL, Johnson R, Kidd D, Chataway J, Bhatia KP, Lees AJ, Hardy J, Revesz T, Houlden H. Widespread Lewy body and tau accumulation in childhood and adult onset dystoniaparkinsonism cases with PLA2G6 mutations. *Neurobiol Aging* 2012;33:814–23.
- Pankratz N, Kissell DK, Pauciulo MW, Halter CA, Rudolph A, Pfeiffer RF, Marder KS, Foroud T, Nichols WC. Parkin dosage mutations have greater pathogenicity in familial PD than simple sequence mutations. *Neurology* 2009;73(4):279–286.
- Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, Bae E, Kim J, Shong M, Kim JM, Chung J. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* 2006; 441: 1157–1161.
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. Reprinted in: *Neuropsychiatric Classics*. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2002;14(2):223-36.
- Parkinson Study Group. Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients requiring levodopa. *Ann Neurol*. 1996;39(1):37-45.
- Pchelina SN, Yakimovskii AF, Emelyanov AK, Ivanova ON, Schwarzman AL, Singleton AB. Screening for LRRK2 mutations in patients with Parkinson's disease in Russia: identification of a novel LRRK2 variant. *Eur J Neurol* 2008;15: 692–696.
- Perez FA, Palmiter RD. Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(6):2174–2179.
- Piccoli G, Condliffe SB, Bauer M, Giesert F, Boldt K, De Astis S, Meixner A, Sarioglu H, Vogt-Weisenhorn DM, Wurst W, Gloeckner CJ, Matteoli M, Sala C, Ueffing M.

- LRRK2 controls synaptic vesicle storage and mobilization within the recycling pool. *J. Neurosci.* 2011; 31: 2225–2237.
- Pirkevi C, Lesage S, Condroyer C, Tomiyama H, Hattori N, Ertan S, Brice A, Basak AN. A LRRK2 G2019S mutation carrier from Turkey shares the Japanese haplotype. *Neurogenetics* 2009;10: 271–273.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the a-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276: 2045–2047.
- Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, Scaravilli F, Eskelson C, Pepivani I, Hedrich K, Adel S, Gonzales-McNeal M, Hilker R, Kramer PL, Klein C.. Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Ann Neurol* 2005;58(3):411–422.
- Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Shrivastava S. A meta-analysis of Parkinsons disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology* 2000; 21(4): 435-40.
- Punia S, Behari M, Govindappa ST, Swaminath PV, Jayaram S, Goyal V, Muthane UB, Juyal RC, Thelma BK. Absence/rarity of commonly reported LRRK2 mutations in Indian Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 2006;409: 83–88.
- Quadri M, Fang M, Picillo M, Olgiati S, Breedveld GJ, Graafland J, Wu B, Xu F, Erro R, Amboni M, Pappatà S, Quarantelli M, Annesi G, Quattrone A, Chien HF, Barbosa ER; International Parkinsonism Genetics Network, Oostra BA, Barone P, Wang J, Bonifati V. Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset parkinsonism. *Hum Mutat* 2013;34:1208–1215.
- Quik M. and Kulak JM. Nicotine and nicotinic receptors; relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 2002; 23(4-5):581-94.
- Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP, Goebel I, Mubaidin AF, Wriekat AL, Roeper J, Al-Din A, Hillmer AM, Karsak M, Liss B, Woods CG, Behrens MI, Kubisch C. Hereditary parkinsonism with dementia is caused

- by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; 38: 1184–1191.
- Ray S, Liu M. Current understanding of LRRK2 in Parkinson's disease: biochemical and structural features and inhibitor design. *Future Med. Chem.* 2012; 4: 1701–1713.
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved Splice Site Detection in Genie. *Journal of Computational Biology* 1997; 4(3): 311-23.
- Rohe CF, Montagna P, Breedveld G, Cortelli P, Oostra BA, Bonifati V. Homozygous PINK1 C terminus mutation causing early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004;56(3):427–431.
- Ross GW and Petrovitch H. Current evidence for neuroprotective effects of nicotine and caffeine against Parkinson's disease. *Drugs Aging*,2001; 18(11):797-806.
- Ross OA, Wu YR, Lee MC, Funayama M, Chen ML, Soto AI, Mata IF, Lee-Chen GJ, Chen CM, Tang M, Zhao Y, Hattori N, Farrer MJ, Tan EK, Wu RM. Analysis of Lrrk2 R1628P as a risk factor for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008;64(1):88–92.
- Ross OA, Spanaki C, Griffith A, Lin CH, Kachergus J, Haugarvoll K, Latsoudis H, Plaitakis A, Ferreira JJ, Sampaio C, Bonifati V, Wu RM, Zabetian CP, Farrer MJ. Haplotype analysis of Lrrk2 R1441H carriers with parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15: 466–467.
- Roux KH. Optimization and troubleshooting in PCR. *PCR Methods Appl* 1995;4(5):S185-94.
- Rozenberg R, Fox DC, Sobreira E, Pereira LV. Detection of 12 new mutations in Gaucher disease Brazilian patients. *Blood Cells Mol Dis* 2006;37(3):204-9.
- Samaranch L, Lorenzo-Betancor O, Arbelo JM, Ferrer I, Lorenzo E, Irigoyen J, Pastor MA, Marrero C, Isla C, Herrera-Henriquez J, Pastor P. PINK1- linked parkinsonism is associated with Lewy body pathology. *Brain* 2010;133:1128–1142.
- Sandebring A, Dehvari N, Perez-Manso M, Thomas KJ, Karpilovski E, Cookson MR, Cowburn RF, Cedazo-Minguez A. Parkin deficiency disrupts calcium homeostasis by modulating phospholipase C signalling. *FEBS Lett* 2009;276:5041–5052.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.

- Santamaria R, Michelakakis H, Moraitou M, Dimitriou E, Dominissini S, Grossi S, Sánchez-Ollé G, Chabás A, Pittis MG, Filocamo M, Vilageliu L, Grinberg D. Haplotype analysis suggests a single Balkan origin for the Gaucher disease [D409H;H255Q] double mutant allele. *Hum Mutat.* 2008;29(6):E58-67.
- Sasaki S, Shirata A, Yamane K, Iwata M. Parkin-positive autosomal recessive juvenile Parkinsonism with alpha-synuclein-positive inclusions. *Neurology* 2004;63(4):678–682.
- Sato C, Morgan A, Lang AE, Salehi-Rad S, Kawarai T, Meng Y, Ray PN, Farrer LA, St George-Hyslop P, Rogaeva E. Analysis of the glucocerebrosidase gene in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2005;20: 367–370.
- Saunders-Pullman R. Estrogens and Parkinson disease: neuroprotective, symptomatic, neither, or both?. *Endocrine* 2003;21:81–87.
- Saunders-Pullman R, Stanley K, San Luciano M, Barrett MJ, Shanker V, Raymond D, Ozelius LJ, Bressman SB. Gender differences in the risk of familial parkinsonism: beyond LRRK2? *Neurosci Lett* 2011;496(2):125-8.
- Schlitter AM, Woitalla D, Mueller T, Epplen JT, Dekomien G. The LRRK2 gene in Parkinson's disease: mutation screening in patients from Germany. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 891–892.
- Schneider SA, Talelli P, Cheeran BJ, Khan NL, Wood NW, Rothwell JC, Bhatia KP. Motor cortical physiology in patients and asymptomatic carriers of parkin gene mutations. *Mov Disord* 2008;23: 1812–1819.
- Schulte EC, Mollenhauer B, Zimprich A, Bereznaï B, Lichtner P, Haubenberger D, et al. Variants in eukaryotic translation initiation factor 4G1 in sporadic Parkinson's disease. *Neurogenetics* 2012;13:281–5.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e57.
- Schrag A, Schott JM. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *Lancet Neurol.* 2006;5(4):355-63.

- Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature Methods* 2010; 7: 575-576.
- Schweitzer KJ, Brüssel T, Leitner P, Krüger R, Bauer P, Woitalla D, Tomiuk J, Gasser T, Berg D. Transcranial ultrasound in different monogenetic subtypes of Parkinson's disease. *J Neurol* 2007;254(5):613-6.
- Seaman MN. Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 68–75.
- Seidel K, Schöls L, Nuber S, Petrasch-Parwez E, Gierga K, Wszolek Z, Dickson D, Gai WP, Bornemann A, Riess O, Rami A, Den Dunnen WF, Deller T, Rüb U, Krüger R. First appraisal of brain pathology owing to A30P mutant alpha-synuclein. *Ann Neurol* 2010;67: 684–689.
- Shannon KM. Movement Disorders, in *Neurology in Clinical Practice*, W.G. Bradley, et al., Editors. 2004, Butterworth Heinemann: Philadelphia. p. 2125-2168.
- Sharma M, Ioannidis JP, Aasly JO, Annesi G, Brice A, Bertram L, Bozi M, Barcikowska M, Crosiers D, Clarke CE, Facheris MF, Farrer M, Garraux G, Gispert S, Auburger G, Vilariño-Güell C, Hadjigeorgiou GM, Hicks AA, Hattori N, Jeon BS, Jamrozik Z, Krygowska-Wajs A, Lesage S, Lill CM, Lin JJ, Lynch T, Lichtner P, Lang AE, Libioulle C, Murata M, Mok V, Jasinska-Myga B, Mellick GD, Morrison KE, Meitnger T, Zimprich A, Opala G, Pramstaller PP, Pichler I, Park SS, Quattrone A, Rogaeva E, Ross OA, Stefanis L, Stockton JD, Satake W, Silburn PA, Strom TM, Theuns J, Tan EK, Toda T, Tomiyama H, Uitti RJ, Van Broeckhoven C, Wirdefeldt K, Wszolek Z, Xiromerisiou G, Yomono HS, Yueh KC, Zhao Y, Gasser T, Maraganore D, Krüger R; GEOPD consortium. A multi-centre clinico-genetic analysis of the VPS35 gene in Parkinson disease indicates reduced penetrance for disease-associated variants. *J Med Genet.* 2012;49(11):721-6.
- Sheerin UM, Charlesworth G, Bras J, Guerreiro R, Bhatia K, Foltynie T, Limousin P, Silveira-Moriyama L, Lees A, Wood N. Screening for VPS35 mutations in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2012;4: 838.e1–e5.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research* 2001; 29(1): 308-11.

- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Yoshikawa M, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Minoshima S, Yamamura Y, Shimizu N, Mizuno Y. Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann Neurol* 1999;45:668–672.
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000;25(3):302–305.
- Shojaee, S., Sina, F., Banihosseini, S. S., Kazemi, M. H., Kalhor, R., Shahidi, G.-A., Fakhrai-Rad, H., Ronaghi, M., Elahi, E. Genome-wide linkage analysis of a parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 1375-1384.
- Shojaee S, Sina F, Farboodi N, Fazlali Z, Ghazavi F, Ghorashi SA, Parsa K, Sadeghi H, Shahidi GA, Ronaghi M, Elahi E. 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: 1023–1027.
- Sidransky E. Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder. *Mol Genet Metab* 2004;83: 6–15.
- Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER, Bar-Shira A, Berg D, Bras J, Brice A, Chen CM, Clark LN, Condroyer C, De Marco EV, Durr A, Eblan MJ, Fahn S, Farrer MJ, Fung HC, Gan-Or Z, Gasser T, Gershoni-Baruch R, Giladi N, Griffith A, Gurevich T, Januario C, Kropp P, Lang AE, Lee-Chen GJ, Lesage S, Marder K, Mata IF, Mirelman A, Mitsui J, Mizuta I, Nicoletti G, Oliveira C, Ottman R, Orr-Urtreger A, Pereira LV, Quattrone A, Rogaeva E, Rolfs A, Rosenbaum H, Rozenberg R, Samii A, Samaddar T, Schulte C, Sharma M, Singleton A, Spitz M, Tan EK, Tayebi N, Toda T, Troiano AR, Tsuji S, Wittstock M, Wolfsberg TG, Wu YR, Zabetian CP, Zhao Y, Ziegler SG. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009;361: 1651–1661.
- Sidransky E. Gaucher disease: insights from a rare Mendelian disorder. *Discov Med*. 2012;14(77):273-81.

- Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Valente EM, Casari G. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet* 2005;14(22):3477–3492.
- Simon-Sanchez J, Marti-Masso JF, Sanchez-Mut JV, Paisan-Ruiz C, Martinez-Gil A, Ruiz-Martinez J, Saenz A, Singleton AB, Lopez de Munain A, Perez-Tur J. Parkinson's disease due to the R1441G mutation in Dardarin: a founder effect in the Basques. *Mov Disord* 2006;21: 1954–1959.
- Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: Progress and therapeutic implications. *Mov Disord* 2013;28:14–23.
- 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: 418–433.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(51):18676–18681.
- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat Neurosci* 2006;9: 1231–1233.
- Snider SR, Fahn S, Isgreen WP, Cote LJ. Primary sensory symptoms in parkinsonism. *Neurology* 1976;26(5):423-9.
- Spanaki C, Latsoudis H, Plaitakis A. LRRK2 mutations on Crete: R1441H associated with PD evolving to PSP. *Neurology* 2006;67: 1518–1519.
- Stern G. Did parkinsonism occur before 1817? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989;Suppl:11-2.
- Sternic N, Kacar A, Filipovic S, Svetel M, Kostic VS. The therapeutic effect of moclobemide, a reversible selective monoamine oxidase A inhibitor, in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol.* 1998;21(2):93-6.
- Stichel CC, Augustin M, Kuhn K, Zhu XR, Engels P, Ullmer C, Lubbert H. Parkin expression in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci* 2000;12: 4181–4194.
- Sun M, Latourelle JC, Wooten GF, Lew MF, Klein C, Shill HA, Golbe LI, Mark MH, Racette BA, Perlmutter JS, Parsian A, Guttman M, Nicholson G, Xu G, Wilk JB,

- Saint-Hilaire MH, DeStefano AL, Prakash R, Williamson S, Suchowersky O, Labelle N, Growdon JH, Singer C, Watts RL, Goldwurm S, Pezzoli G, Baker KB, Pramstaller PP, Burn DJ, Chinnery PF, Sherman S, Vieregge P, Litvan I, Gillis T, MacDonald ME, Myers RH, Gusella JF. Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial Parkinson disease: the GenePD study. *Arch Neurol* 2006;63(6):826–832.
- Takahashi H, Ohama E, Suzuki S, Horikawa Y, Ishikawa A, Morita T, Tsuji S, Ikuta F. Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathologic study in a family. *Neurology* 1994;44(3 pt 1):437–441.
- Takahashi-Niki K, Niki T, Taira T, Iguchi-Arigo SM, Ariga H. Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320(2):389–397.
- Tan EK, Yew K, Chua E, Shen H, Jamora RD, Lee E, Puong KY, Zhao Y, Pavanni R, Wong MC, Puvan K, Yih Y, Tan LC. Analysis of PINK1 in Asian patients with familial parkinsonism. *Clin Genet* 2005;68(5):468–470.
- Tan EK, Yew K, Chua E, Puvan K, Shen H, Lee E, Puong KY, Zhao Y, Pavanni R, Wong MC, Jamora D, de Silva D, Moe KT, Woon FP, Yuen Y, Tan L. PINK1 mutations in sporadic early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006;21(6):789–793.
- Tan EK: The role of common genetic risk variants in Parkinson disease. *Clinical genetics* 2007;72:387–93.
- Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen DF, Karbowski M, Youle RJ. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* 2010;191: 1367–1380.
- Tandberg E, Larsen JP, Karlsen K. A community-based study of sleep disorders in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*. 1998;13(6):895-9.
- Tanner CM, Langston JW. Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology* 1990;40:17-30.
- Tassin J, Dürr A, de Broucker T, Abbas N, Bonifati V, De Michele G, Bonnet AM, Broussolle E, Pollak P, Vidailhet M, De Mari M, Marconi R, Medjbeur S, Filla A, Meco G, Agid Y, Brice A. Chromosome 6-linked autosomal recessive early-onset Parkinsonism: linkage in European and Algerian families, extension of the clinical



- spectrum, and evidence of a small homozygous deletion in one family. The French Parkinson's Disease Genetics Study Group, and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Am J Hum Genet* 1998;63(1):88–94.
- Tayebi N, Callahan M, Madike V, Stubblefield BK, Orvisky E, Krasnewich D, Fillano JJ, Sidransky E. Gaucher disease and parkinsonism: a phenotypic and genotypic characterization. *Mol Genet Metab*. 2001;73(4):313-21.
- Taylor KSM, Cook JA, Counsell CE. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78:905–912.
- Tofaris GK. Lysosome-Dependent Pathways as a Unifying Theme in Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 2012;27(11):1364-9.
- Tomiya H, Li Y, Funayama M, Hasegawa K, Yoshino H, Kubo S, Sato K, Hattori T, Lu CS, Inzelberg R, Djaldetti R, Melamed E, Amouri R, Gouider-Khouja N, Hentati F, Hatano Y, Wang M, Imamichi Y, Mizoguchi K, Miyajima H, Obata F, Toda T, Farrer MJ, Mizuno Y, Hattori N. Clinicogenetic study of mutations in LRRK2 exon 41 in Parkinson's disease patients from 18 countries. *Mov Disord* 2006;21: 1102–1108.
- Tong Y, Pisani A, Martella G, Karouani M, Yamaguchi H, Pothos EN, Shen J. R1441C mutation in LRRK2 impairs dopaminergic neurotransmission in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106: 14622–14627.
- Torralba MA, Pérez-Calvo JI, Pastores GM, Cenarro A, Giraldo P, Pocoví M. Identification and characterization of a novel mutation c.1090G>T (G325W) and nine common mutant alleles leading to Gaucher disease in Spanish patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2001;27(2):489-95.
- Tretiakoff K. Contribution a l'Etude de L'Anatomie pathologique du Locus Niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et De La Maladie de Parkinson. These the Paris, 1919.
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 2012;40(15):e115.
- Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Albanese A, Wood NW. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset

- parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J Hum Genet* 2001;68(4):895–900.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 2004;304(5674):1158-60.
- Vekrellis K, Rideout HJ, Stefanis L. Neurobiology of alpha-synuclein. *Mol Neurobiol.* 2004;30(1):1-21.
- Verbaan D, Marinus J, Visser M, van Rooden SM, Stiggelbout AM, van Hilten JJ. Patient-reported autonomic symptoms in Parkinson disease. *Neurology* 2007. 69(4):333-41.
- Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, Dachsel JC, Kachergus JM, Lincoln SJ, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Wilhoite GJ, Bacon JA, Behrouz B, Melrose HL, Hentati E, Puschmann A, Evans DM, Conibear E, Wasserman WW, Aasly JO, Burkhard PR, Djaldetti R, Ghika J, Hentati F, Krygowska-Wajs A, Lynch T, Melamed E, Rajput A, Rajput AH, Solida A, Wu RM, Uitti RJ, Wszolek ZK, Vingerhoets F, Farrer MJ. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011;89:162–7.
- Vingerhoets FJ, Snow BJ, Tetrud JW, Langston JW, Schulzer M, Calne DB. Positron emission tomographic evidence for progression of human MPTP-induced dopaminergic lesions. *Annals of Neurology* 1994; 36: 765-770.
- Vithayathil J, Gibney G, Baxevanis AD, Stubblefield BK, Sidransky E, Tayebi N. Glucocerebrosidase mutation H255Q appears to be exclusively in cis with D409H: structural implications. *Clin Genet.* 2009;75(5):503-4.
- Vlajinac HD, Sipetic SB, Maksimovic JM, Marinkovic JM, Dzoljic ED, Ratkov IS, Kostic VS. Environmental factors and Parkinson's disease: a case-control study in Belgrade, Serbia. *Int J Neurosci.* 2010;120(5):361-7.
- Volles MJ, Lee SJ, Rochet JC, Shtilerman MD, Ding TT, Kessler JC, Lansbury PT. Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry* 2001;40(26):7812-9.

- Von Coelln R, Dawson VL, Dawson TM. Parkin-associated Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 2004;318(1):175–184.
- Von Coelln R, Thomas B, Savitt JM, Lim KL, Sasaki M, Hess EJ, Dawson VL, Dawson TM. Loss of locus coeruleus neurons and reduced startle in parkin null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(29):10744–10749. a
- Walsh K and Bennett G. Parkinson's disease and anxiety. *Postgrad Med* 2001; 77: 89-93.
- Wan L, Hsu CM, Tsai CH, Lee CC, Hwu WL, Tsai FJ. Mutation analysis of Gaucher disease patients in Taiwan: high prevalence of the RecNciI and L444P mutations. *Blood Cells Mol Dis* 2006;36: 422–425.
- Wang C, Tan JM, Ho MW, Zaiden N, Wong SH, Chew CL, Eng PW, Lim TM, Dawson TM, Lim KL. Alterations in the solubility and intracellular localization of parkin by several familial Parkinson's disease-linked point mutations. *J Neurochem* 2005;93(2): 422–431.
- Wang Y, Clark LN, Louis ED, Mejia-Santana H, Harris J, Cote LJ, Waters C, Andrews H, Ford B, Frucht S, Fahn S, Ottman R, Rabinowitz D, Marder K. Risk of Parkinson disease in carriers of parkin mutations: estimation using the kin-cohort method. *Arch Neurol.* 2008 Apr;65(4):467-74.
- Warren L, Gibson R, Ishihara L, Elango R, Xue Z, Akkari A, Ragone L, Pahwa R, Jankovic J, Nance M, Freeman A, Watts RL, Hentati F. A founding LRRK2 haplotype shared by Tunisian, US, European and Middle Eastern families with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14: 77–80.
- Weintraub D, Moberg PJ, Duda JE, Katz IR, Stern MB. Effect of psychiatric and other nonmotor symptoms on disability in Parkinson's disease. *J Am Geriatr Soc* 2004; 52(5) 784-788.
- West AB, Moore DJ, Biskup S, Bugayenko A, Smith WW, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(46):16842–16847.
- Wider C, Vilariño-Güell C, Jasinska-Myga B, Heckman MG, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Aasly JO, Gibson JM, Lynch T, Uitti RJ, Wszolek ZK, Farrer MJ, Ross OA.

- Association of the MAPT locus with Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2010;17(3):483-6.
- Wooten G.F., Currie L.J., Bovbjerg V.E., Lee J.K., Patrie J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 2004;75:637–639.
- Wu ZY, Lin Y, Chen WJ, Zhao GX, Xie H, Murong SX, Wang N. Molecular analyses of GCH-1, TH and parkin genes in Chinese dopa-responsive dystonia families. *Clin Genet.* 2008;74(6):513-21.
- Xilouri M, Stefanis L. Autophagic pathways in Parkinson disease and related disorders. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e8.
- Xiromerisiou G, Hadjigeorgiou GM, Gourbali V, Johnson J, Papakonstantinou I, Papadimitriou A, Singleton AB. Screening for SNCA and LRRK2 mutations in Greek sporadic and autosomal dominant Parkinson's disease: identification of two novel LRRK2 variants. *Eur J Neurol* 2007;14: 7–11.
- Zabetian CP, Samii A, Mosley AD, Roberts JW, Leis BC, Yearout D, Raskind WH, Griffith A. A clinic-based study of the LRRK2 gene in Parkinson disease yields new mutations. *Neurology* 2005;65: 741–744.
- Zabetian CP, Hutter CM, Yearout D, Lopez AN, Factor SA, Griffith A, Leis BC, Bird TD, Nutt JG, Higgins DS, Roberts JW, Kay DM, Edwards KL, Samii A, Payami H. LRRK2 G2019S in families with Parkinson disease who originated from Europe and the Middle East: evidence of two distinct founding events beginning two millennia ago. *Am J Hum Genet* 2006;79(4):752–758. a
- Zabetian CP, Morino H, Ujike H, Yamamoto M, Oda M, Maruyama H, Izumi Y, Kaji R, Griffith A, Leis BC, Roberts JW, Yearout D, Samii A, Kawakami H. Identification and haplotype analysis of LRRK2 G2019S in Japanese patients with Parkinson disease. *Neurology* 2006;67: 697–699. b
- Zabetian CP, Yamamoto M, Lopez AN, Ujike H, Mata IF, Izumi Y, Kaji R, Maruyama H, Morino H, Oda M, Hutter CM, Edwards KL, Schellenberg GD, Tsuang DW, Yearout D, Larson EB, Kawakami H. LRRK2 mutations and risk variants in Japanese patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009;24: 1034–1041.

- Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez TE, del Ser T, Munoz DG, de Yebenes JG.. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004;55:164–173.
- Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, Cui Y, Yan XX, Yang HT, Yang RD, Chu TS, Zhang C, Zhang L, Han JW, Yu GQ, Quan C, Yu YX, Zhang Z, Shi BQ, Zhang LH, Cheng H, Wang CY, Lin Y, Zheng HF, Fu XA, Zuo XB, Wang Q, Long H, Sun YP, Cheng YL, Tian HQ, Zhou FS, Liu HX, Lu WS, He SM, Du WL, Shen M, Jin QY, Wang Y, Low HQ, Erwin T, Yang NH, Li JY, Zhao X, Jiao YL, Mao LG, Yin G, Jiang ZX, Wang XD, Yu JP, Hu ZH, Gong CH, Liu YQ, Liu RY, Wang DM, Wei D, Liu JX, Cao WK, Cao HZ, Li YP, Yan WG, Wei SY, Wang KJ, Hibberd ML, Yang S, Zhang XJ, Liu JJ. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med*. 2009;361(27):2609-18.
- Zhao T, Zondervan-van der Linde H, Severijnen LA, Oostra BA, Willemsen R, Bonifati V. Dopaminergic neuronal loss and dopamine-dependent locomotor defects in Fbxo7-deficient zebrafish. *PLoS One*. 2012;7(11):e48911.
- Zhao T, Severijnen LA, van der Weiden M, Zheng PP, Oostra BA, Hukema RK, Willemsen R, Kros JM, Bonifati V. FBXO7 immunoreactivity in alpha-synuclein-containing inclusions in Parkinson disease and multiple system atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013;72:482–8.
- Zimprich A, Muller-Myhsok B, Farrer M, Leitner P, Sharma M, Hulihan M, Lockhart P, Strongosky A, Kachergus J, Calne DB, Stoessl J, Uitti RJ, Pfeiffer RF, Trenkwalder C, Homann N, Ott E, Wenzel K, Asmus F, Hardy J, Wszolek Z, Gasser T. The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *Am J Hum Genet* 2004;74(1):11–19.a
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Muller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004;44: 601–607. b

Zimprich A, Benet-Pagès A, Struhal W, Graf E, Eck SH, Offman MN, Haubenberger D, Spielberger S, Schulte EC, Lichtner P, Rossle SC, Klopp N, Wolf E, Seppi K, Pirker W, Presslauer S, Mollenhauer B, Katzenschlager R, Foki T, Hotzy C, Reinthaler E, Harutyunyan A, Kralovics R, Peters A, Zimprich F, Brücke T, Poewe W, Auff E, Trenkwalder C, Rost B, Ransmayr G, Winkelmann J, Meitinger T, Strom TM. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011;89:168–75.

Ziviani E, Tao RN, Whitworth AJ. *Drosophila* Parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates Mitofusin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:5018–5023.

Exome Aggregation Consortium (ExAC), Cambridge, MA (URL: <http://exac.broadinstitute.org>) [januar, 2015].

The Human Gene Mutation Database (HGMD), URL: <http://www.hgmd.org>

1000 Genomes URL: <http://browser.1000genomes.org/index.html>

Parkinsons disease mutation database (PdmutDB) URL: <http://www.molgen.vib-ua.be/PDMutDB/>

dbSNP142 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>

<http://www.qiagen.com>

<http://www.ensembl.org/index.html>

<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/all.php>

<http://www.mlpa.com>

<http://www.mutationtaster.org/>

<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>

<http://sift.jcvi.org>

<http://mutdb.org/mutpred>

<http://provean.jcvi.org>

<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>

[http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>

## **8. *Biografija autora***

## 8. BIOGRAFIJA AUTORA

Milena (Zoran) Janković je rođena 06.04.1982. godine, u Beogradu, Republika Srbija. Diplomirala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija, izborna oblast Biologija mikroorganizama, 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,19. Diplomski rad, pod nazivom "Efekat metaboličke transformacije na antimutageni potencijal linalola u *E.coli* WP2 " odbranila je ocenom 10.

Školske 2009/2010. godine je upisala prvu godinu doktorskih studija Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, modul Genetika.

Od juna 2010. godine do kraja 2010. godine je bila angažovana na projektu Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine "Istraživanje kliničkih i genetičkih korelacija motornih i nemotornih ispoljavanja bolesti nevoljnih pokreta" čiji je rukovodilac bio prof. dr Vladimir Kostić. Od januara 2011. do oktobra 2013. godine je bila zaposlena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu u okviru dva projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Projektom "Motorni i nemotorni simptomi parkinsonizma – kliničke, morfološke i molekularno-genetičke korelacije" rukovodi prof dr. Vladimir Kostić, a projektom "Analiza genetičkih markera mišićne distonije" rukovodi prof dr. Ivana Novaković.

Od oktobra 2013. godine zaposlena je na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije kao diplomirani biolog u Laboratoriji za genetičku i molekularnu dijagnostiku neuroloških bolesti.



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Милена Јанковић \_\_\_\_\_  
број индекса \_\_\_\_\_ Б3509/2009 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

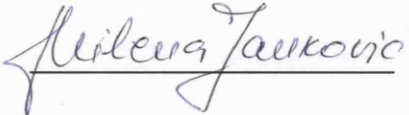
Студија генетичке основе Паркинсонове болести код становништва Србије

---

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 11.05.2015. \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Милена Јанковић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ Б3509/2009 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Биологија: Генетика \_\_\_\_\_

Наслов рада \_\_\_\_\_ Студија генетичке основе Паркинсонове болести  
\_\_\_\_\_ код становништва Србије \_\_\_\_\_

Ментор \_\_\_\_\_ проф др. Владимир Костић; проф. др Марија Гућ Шћекић \_\_\_\_\_

Потписани/а \_\_\_\_\_ Милена Јанковић \_\_\_\_\_

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 11.05.2015. \_\_\_\_\_

 \_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Студија генетичке основе Паркинсонове болести код становништва Србије

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, \_\_\_\_\_ 11.05.2015 \_\_\_\_\_



1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.