

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Neurovědy



MUDr. Ondřej Fiala

Genetika a fenotypová charakteristika Parkinsonovy nemoci s časným začátkem

Genetics and phenotypic characteristics of early-onset Parkinson's disease

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Evžen Růžička, DrSc., FCMA

Konzultant: Prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20. 6. 2014

MUDr. Ondřej Fiala

Identifikační záznam:

FIALA, Ondřej. *Genetika a fenotypová charakteristika Parkinsonovy nemoci s časným začátkem. [Genetics and phenotypic characteristics of early-onset Parkinson's disease]*. Praha, 2013. 105 s., 2 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Neurologická klinika. Školitel Růžička, Evžen.

Abstrakt

Úvod: Mutace genu *parkin* (PARK2), asociované s autozomálně recesivní Parkinsonovou nemocí s časným začátkem (EOPD), mají v různých populacích variabilní četnost. Cílem této práce je popsat fenotypovou charakteristiku českých pacientů s EOPD, zhodnotit vliv faktorů vnějšího prostředí na riziko onemocnění a určit frekvenci alelických variant *parkinu* ve skupině pacientů a kontrol.

Metodika: Celkem u 70 pacientů s EOPD (věk při vzniku nemoci ≤ 40 let) a 75 kontrol byla provedena fenotypová charakteristika a analýza alelických variant *parkinu*.

Výsledky: V souboru nemocných byly zachyceny tyto hlavní fenotypové rysy: absence kognitivního deficitu, častý výskyt dystonie, deprese a hyperhidrózy, výborná odpovídavost na dopaminergní léčbu, brzký rozvoj polékových dyskinezií a hybných fluktuací. Pacienti s mutacemi *parkinu* měli signifikantně nižší věk při vzniku onemocnění. Práce v zemědělství a expozice chemikáliím byly spojeny s vyšším rizikem EOPD, naopak pití kávy představovalo protektivní faktor. Mutace *parkinu* jsme identifikovali u pěti pacientů (7.1%): bodová mutace p.R334C byla přítomna u jednoho nemocného, čtyři pacienti měli exonové delece. Kromě jedné homozygotní delece exonu 4, se všechny nalezené mutace nacházely v heterozygotní konstituci. V kontrolní skupině mutace zachyceny nebyly. Polymorfismy p.S167N a p.D394N byly přítomny v podobném procentu mezi pacienty i kontrolami, polymorfismus p.V380L se vyskytoval s téměř dvakrát vyšší frekvencí v kontrolní skupině, kde jsme také zachytili novou alelickou variantu p.V380I.

Závěr: Klinická charakteristika pacientů odpovídá předchozím popisům fenotypu EOPD. Nízká prevalence mutací *parkinu* svědčí pro úlohu dalších genů v patogenezi onemocnění u slovanské populace.

Klíčová slova: alelické varianty, fenotyp, genotyp, mutace, PARK2, parkin, Parkinsonova nemoc s časným začátkem, polymorfismy

Abstract

Objective: Mutations in the *parkin* (PARK2) gene have been associated with autosomal recessive early-onset Parkinson's disease (EOPD) with various frequencies in different populations. The aim of the study is to describe phenotypic characteristics of Czech EOPD patients, to evaluate the influence of environmental risk factors, and to determine the frequency of *parkin* allelic variants in patients and healthy controls.

Methods: A total of 70 EOPD patients (age at onset \leq 40 years) and 75 controls were phenotyped and screened for the sequence variants and exon rearrangements in the *parkin* gene.

Results: The main features in the phenotype of the patients' sample were: the absence of cognitive deficit, high occurrence of dystonia, depression, hyperhidrosis, an excellent response to dopaminergic therapy, early onset of dyskinesia and motor fluctuation. Patients with mutations in the *parkin* gene had significantly lower age at onset. The agricultural occupation and work with chemicals increased the risk of EOPD, however the coffee drinking appeared to be a protective factor. *Parkin* mutations were identified in five patients (7.1%): the p.R334C point mutation was present in one patient, four patients had exon deletions. The detected mutations were observed in the heterozygous state except one homozygous deletion of the exon 4. No mutations were obtained in control subjects. A novel sequence variant p.V380I (c.1138G>A) was identified in one control. Polymorphisms p.S167N and p.D394N were seen in similar percentage in patients and controls, polymorphism p.V380L was almost twice as frequent in controls as in patients.

Conclusions: The clinical characteristics of patients correspond to previous descriptions of EOPD phenotype. Our study contributes to the growing body of evidence on the low frequency of the *parkin* mutations in the EOPD suggesting the potential role of other genes in the pathogenesis of the disease in Slavic population.

Key words: allelic variants, early-onset Parkinson's disease, genotype, mutations, PARK2, parkin, phenotype, polymorphisms

Obsah

1.	Úvod.....	8
1.1.	Parkinsonova nemoc a její patogeneze.....	8
1.2.	Parkinsonova nemoc s časným začátkem.....	10
1.3.	Genetika Parkinsonovy nemoci.....	12
1.4.	Výzkumné přístupy k hledání genetických změn u Parkinsonovy nemoci.....	14
1.5.	PARK2 - parkin.....	18
1.6.	Další geny asociované s monogenní formou Parkinsonovy nemoci.....	22
1.6.1.	PARK1/4 - SNCA.....	22
1.6.2.	PARK3.....	24
1.6.3.	PARK5 - UCH-L1.....	24
1.6.4.	PARK6 - PINK1.....	25
1.6.5.	PARK7 - DJ-1.....	25
1.6.6.	PARK8 - LRRK2.....	26
1.6.7.	PARK9 - ATP13A2.....	27
1.6.8.	PARK10.....	28
1.6.9.	PARK11.....	28
1.6.10.	PARK12.....	29
1.6.11.	PARK13 - HRTA2/OMI.....	29
1.6.12.	PARK14 - PLA2G6.....	30
1.6.13.	PARK15 - FBXO7.....	30
1.6.14.	PARK16.....	31
1.6.15.	PARK17 - VPS35.....	31
1.6.16.	PARK18 - EIF4G1.....	31
1.6.17.	PARK19 - DNAJC6.....	32
1.6.18.	PARK20 - SYNJ1.....	32
1.7.	Geny ovlivňující riziko vzniku Parkinsonovy nemoci.....	33
1.8.	Mitochondriální DNA.....	35
2.	Cíle a hypotézy.....	36
3.	Metodika.....	37
3.1.	Pacienti a kontroly.....	37
3.2.	Genetické analýzy.....	38
3.2.1.	Izolace DNA.....	38
3.2.2.	Analýza genetických změn <i>parkinu</i> u pacientů.....	38
3.2.3.	Analýza genetických změn <i>parkinu</i> u kontrol.....	38

3.2.4.	Analýza exonových delecí a multiplikací <i>parkinu</i> u pacientů a kontrol	39
3.2.5.	Klasifikace, patogenita a frekvence genetických změn <i>parkinu</i>	40
3.3.	Statistická analýza	42
4.	Výsledky	43
4.1.	Fenotypová charakteristika pacientů	43
4.1.1.	Začátek, trvání, tíže a rodinný výskyt onemocnění	43
4.1.2.	Motorické příznaky	43
4.1.3.	Non-motorické příznaky	44
4.1.4.	Komplikace, fluktuace hybnosti a polékové dyskineze	44
4.1.5.	Léčba	44
4.2.	Rizikové faktory u pacientů a kontrol	48
4.2.1.	Kouření	48
4.2.2.	Pití kávy	48
4.2.3.	Práce v zemědělství a expozice chemikáliím	48
4.3.	Alelické varianty <i>parkinu</i> u pacientů a kontrol	51
4.4.	Testování hypotéz	56
5.	Diskuse	57
5.1.	Fenotyp	57
5.1.1.	Začátek onemocnění, diagnóza	57
5.1.2.	Motorické příznaky	59
5.1.3.	Non-motorické příznaky	60
5.1.4.	Komplikace, fluktuace hybnosti a polékové dyskineze	61
5.1.5.	Léčba	61
5.2.	Rizikové faktory	63
5.3.	Genotyp	65
5.3.1.	Polymorfismy	65
5.3.2.	Vzácné alelické varianty	65
5.3.3.	Mutace	66
5.3.4.	Rozdíly v prevalenci alelických změn <i>parkinu</i> u pacientů a kontrol	68
5.4.	Soubor pacientů a statistická analýza	69
6.	Závěr	70
7.	Poděkování	71
8.	Seznam použitých zkratk	72
9.	Literatura	73
10.	Přílohy	105

1. Úvod

1.1. Parkinsonova nemoc a její patogeneze

Parkinsonova nemoc (PN) je druhým nejčastějším neurodegenerativním onemocněním postihujícím celosvětově více než 1% osob starších 60 let (de Lau L.M. & Breteler M.M., 2006). Klinický obraz PN je charakterizován přítomností klidového třesu, bradykineze, rigidity a posturální instability. Hybné postižení bývá stranově asymetrické a je doprovázeno non-motorickými projevy, k nimž patří vegetativní dysfunkce, kognitivní deficit a další psychiatrické komplikace (Jankovic J., 2008). Důležitým rysem onemocnění je odpovídavost příznaků na dopaminergní terapii. PN má progresivní charakter, kauzální terapie neexistuje.

V neuropatologickém nálezu nacházíme masivní úbytek dopaminergních neuronů v substantia nigra pars compacta (SNc), makroskopicky se manifestující depigmentací této oblasti (ztráta neuromelaninu) (Schulz J.B. & Falkenburger B.H., 2004). Typická je přítomnost eozinofilních nitrobuněčných inkluzí, tzv. Lewyho tělísek, která obsahují agregáty alfa-synukleinu a dalších substancí (Wakabayashi K. et al., 2007). Degenerativní změny a Lewyho tělíška bývají kromě SNc přítomny i v jiných částech mozku, což odpovídá novému pohledu na PN jako na onemocnění, které postihuje celý nervový systém (Braak H. et al., 2003).

Molekulární patogeneze PN je složitou mozaikou různě významných a vzájemně interagujících patogenních mechanismů. K nejvýznamnějším patří agregace alfa-synukleinu (Kalia L.V. et al., 2013), poruchy odbourávání proteinů v ubiquitin-proteazomovém systému (UPS) (Tanaka K. & Matsuda N., 2014) a lysozomech (Dehay B. et al., 2013), mitochondriální dysfunkce a oxidativní stres (Exner N. et al., 2012), narušení transportu synaptických vezikul (Esposito G. et al., 2012), zánětlivá reakce (Deleidi M. & Gasser T., 2013) spojená s gliální aktivací (Halliday G.M. & Stevens C.H., 2011), aberantní reaktivace buněčného cyklu (Devine M.J. et al., 2011) či dysregulace apoptózy (Venderova K. & Park D.S., 2012). Tyto patologické změny

vznikají na základě několika primárních příčin. Jsou jimi negativní vlivy vnějšího prostředí (Kieburz K. & Wunderle K.B., 2013), biologické stárnutí (Douglas P.M. & Dillin A., 2010) a genetické změny (mutace a polymorfismy) (Lubbe S. & Morris H.R., 2014), kterými se blíže zabývá tato práce.

1.2. Parkinsonova nemoc s časným začátkem

PN začíná nejčastěji mezi 60. - 70. rokem věku (Twelves D. et al., 2003). V anglosaské literatuře bývá pro tuto formu užíváno označení late-onset (PN s pozdním začátkem, dále jen LOPD) a její projevy odpovídají "klasickému" obrazu PN. Asi 3 - 5% nemocných má první příznaky nemoci již před 40. rokem věku (Schrag A. & Schott J.M., 2006). Incidence této vzácné formy PN, zvané early-onset (PN s časným začátkem, dále jen EOPD), je odhadována na 0,5 na 100 000 (Van Den Eeden S.K. et al., 2003).

Fenotyp EOPD se od klasické PN do určité míry odlišuje. Pacienti s časným začátkem mají obvykle pomalejší progresi onemocnění, dobrou odpověď na dopaminergní terapii a brzký rozvoj polékových dyskinezií. Častá je přítomnost dystonie a zlepšení motorických příznaků po vyspání (tzv. sleep benefit). Kognitivní funkce zůstávají u většiny nemocných dlouhou dobu normální (Schrag A. & Schott J.M., 2006).

Rovněž histopatologický nález neodpovídá zcela obrazu klasické PN ani neuropatologickým stádiím dle Braaka (Braak H. et al., 2003). U EOPD obvykle chybí Lewyho tělíska, neurodegenerace (úbytek neuronů) se omezuje zejména na oblast SNc a locus coeruleus (Doherty K.M. et al., 2013). Z tohoto důvodu bývá EOPD některými autory označována jako nigropatie (Ahlskog J.E., 2009). Histopatologické odlišnosti nasvědčují hypotéze, že EOPD oproti klasické formě PN vzniká na základě odlišných patogenních mechanismů rezultujících ve ztrátu dopaminergních neuronů. Z tohoto pohledu lze PN považovat za etiologicky heterogenní nozologickou jednotku s více či méně podobným fenotypem (Weiner W.J., 2008).

Nejčastější genetickou změnou asociovanou s EOPD jsou mutace v genu *parkin* (PARK2). Lücking et al. publikoval přítomnost mutací parkinu u 50% familiárních a 18% sporadických forem EOPD (Lücking C.B. et al., 2000). Naopak v jiných studiích byla frekvence patogenních mutací *parkinu* u EOPD podstatně nižší (1,6 - 8,6%)

(Brooks J. et al., 2009; Kilarski L.L. et al., 2012; Koziorowski D. et al., 2010). Výrazné rozdíly v prevalenci mutací mezi jednotlivými studiemi jsou pravděpodobně způsobeny populačně specifickou variabilitou četnosti alelických variant *parkinu* (Kilarski L.L. et al., 2012).

1.3. Genetika Parkinsonovy nemoci

Zmínky o hereditárních aspektech PN jsou staré více než 100 let. Již Leroux (Leroux P., 1890) a Gowers (Gowers W., 1900) upozorňují na relativně vysoké procento familiárního výskytu PN. Přesto byla PN dlouho považována za výhradně sporadické onemocnění. Přelom ve výzkumu genetiky PN nastal až v 90. letech 20. století. V současné době je známo 19 lokusů a 14 genů (tabulka 1a, 1b) v nichž byly identifikovány mutace zodpovědné za monogenní PN. Tato forma PN je přenášena vždy jen jedním genem a tvoří asi 5 - 10% z celkového počtu onemocnění (Lesage S. & Brice A., 2009).

Výskyt PN u několika členů rodiny (< 10% nemocných) (Thomas B. & Beal M.F., 2007) svědčí pro možný genetický přenos, nicméně svoji roli mohou sehrát i sdílené vlivy prostředí. Pravděpodobnost záchytu mutace u familiární formy PN je značně vysoká (až 30%), nelze ji však vyloučit ani u sporadických případů (3-5%) (Klein C. & Westenberger A., 2012).

Přítomnost mutace ještě neznamená, že dojde k rozvoji onemocnění. O jejím fenotypovém projevu - penetranci, rozhoduje celá řada proměnných. Některé mutace zasahují do patogeneze v takové míře, že nemoc propukne vždy bez ohledu na okolní vlivy (kompletní penetrance). V jiných případech genetická změna indukuje pouze částečnou odchylku od normy a pro její uplatnění je třeba spolupůsobení dalších faktorů (inkompletní penetrance). Takovým příkladem je věkově vázaná penetrance, kdy se zděděná vloha manifestuje až v přítomnosti patologických změn, hromadících se v průběhu stárnutí.

Genetické odchylky nenalzáme jen v exonovém úseku genu (části kódující protein), ale mohou se vyskytovat i v jiných oblastech, např. promotoru, jehož změny ovlivňují genovou expresi. Genetické změny, které mohou zvyšovat riziko rozvoje PN, ale samy o sobě onemocnění nevyvolávají, označujeme jako polymorfismy (frekvence > 1%

populace) a vzácné alelické varianty (frekvence < 1% populace). Na rozdíl od mutací, které působí vznik defektního proteinu a rozvoj onemocnění, polymorfismy a alelické varianty pouze částečně pozměňují funkci bílkoviny, narušují její subcelulární lokalizaci nebo ovlivňují míru exprese (tzv. genetické změny malého efektu).

U monogenní PN se předpokládají mendelovská pravidla autozomálně dominantní (AD) a autozomálně recesivní (AR) dědičnosti. Prevalence mutací a typ jejich přenosu se u jednotlivých forem monogenní PN liší. U late-onset fenotypu, který je obvykle spojen s AD přenosem, mutace nacházíme v 1-3%, early-onset forma PN se dědí převážně AR a mutace jsou přítomny až ve 20% případů (Klein C., 2006). Souhrn jednotlivých forem PN a četnost výskytu mutací uvádí tabulka 2.

1.4. Výzkumné přístupy k hledání genetických změn u Parkinsonovy nemoci

Vazebná analýza (linkage mapping) postižených rodin je tradiční metodou hledání mutací s vysokou penetrancí. Tímto postupem byla popsána většina lokusů PN, ve kterých se následně podařilo identifikovat kauzální geny, jejichž mutace jsou zodpovědné za monogenní PN. Tato forma nemoci však tvoří jen zlomek všech případů onemocnění. Tam, kde nelze vystopovat mendelovská pravidla pro jeden příčinný gen, mohou sehrát úlohu genetické varianty, které mají v populaci vysokou frekvenci a pouze modifikují riziko (odds ratio $< 1,5$) vzniku onemocnění. Průlom v hledání těchto změn tzv. „malého efektu“ představují celogenomové asociační studie (genome-wide association), díky nimž se v posledních pěti letech podařilo odhalit více než 20 kandidátních genů PN (Singleton A.B. et al., 2013). Zdá se však, že i tyto frekventní varianty mají úlohu v patogenezi pouze u malého počtu ze všech onemocnění (Keller M.F. et al., 2012). Je pravděpodobné, že na pozadí většiny případů dědičnosti stojí genetické změny, které nejsou natolik časté, aby mohly být zachyceny v celogenomových asociačních studiích a nemají takovou penetranci, aby je bylo možné identifikovat pomocí vazebných studií (Bonifati V., 2014). Techniky sekvenování nové generace (next-generation sequencing), kterými lze analyzovat celý exom či dokonce genom, jsou nejnovějším přístupem k hledání vzácnějších genetických alterací s nízkou penetrancí (Metzker M.L., 2010). Rychle narůstající množství nově popsaných genetických variant sebou však přináší nutnost přesnější interpretace kauzality získaných nálezů (MacArthur D.G. et al., 2014) a mnohem užšího vymezení charakteristiky odpovídajícího fenotypu (Grunewald A. et al., 2013).

Tabulka 1a. Geny asociované s monogenní formou Parkinsonovy nemoci

genotyp & fenotyp								protein		
lokus	gen & protein	dědičnost	převládající fenotyp	chromozóm	počet exonů	četnost mutací u PN	počet známých mutací	počet AMK	funkční zapojení proteinu	patogenní mechanismy
PARK1 (PARK4)	SNCA, alfa-synuklein	AD	LOPD	4q22.1	6	vzácná < 1%	5 bodových + multiplikace	140	funkce vezikul, synaptická plasticita, metabolismus dopaminu	tvorba toxických oligomerů
PARK2	parkin	AR	EOPD	6q26	12	famil. až 50% sporad. 2-18%	> 180	465	degradace proteinů v UPS, stavba a funkce mitochondrií, anti-apoptické působení	ztráta funkce, tvorba toxických agregátů
PARK3	?	AD	LOPD	2p13	-	-	-	-	-	-
PARK5	UCH-L1	AD	LOPD	4p14	9	raritní (1 rodina)	1	212	recyklace volného ubikvitinu	ztráta funkce
PARK6	PINK1	AR	EOPD	1p36.12	8	famil. 4-5% sporad. 1-2%	> 50	581	stavba a funkce mitochondrií, anti-apoptické působení	ztráta funkce
PARK7	DJ-1	AR	EOPD	1p36.23	8	vzácná < 1%	> 15	189	mitochondriální antioxidant, anti-apoptické působení	ztráta funkce
PARK8	LRRK2	AD	LOPD	12q12	51	famil. 5-6% sporad. 1-2%	7	2527	vývoj CNS, stavba mikrotubulů, funkce axonů, vezikul, mitochondrií, lysozomů a UPS, imunitní odpověď	aberrantní kinázová a GTPázová aktivita
PARK9	ATP13A2	AR	Kufor-Rakeb EOPD juvenilní PN	1p36	29	vzácná < 1%	5	1180	funkce lysozomů a mitochondrií, vezikulární transport	porucha subcelulární lokalizace, ztráta funkce
PARK10	?	?	LOPD	1p32	-	-	-	-	-	-
PARK11	?	AD	LOPD	2q36-37	-	-	-	-	-	-

AD - autozomálně dominantní, AR - autozomálně recesivní, CNS - centrální nervová soustava, EOPD - early-onset Parkinsonova nemoc, LOPD - late-onset Parkinsonova nemoc, PN - Parkinsonova nemoc, UPS - ubikvitin-proteazomový systém

Tabulka 1b. Geny asociované s monogenní formou Parkinsonovy nemoci

genotyp & fenotyp								protein		
lokus	gen & protein	dědičnost	převládající fenotyp	chromozóm	počet exonů	četnost mutací u PN	počet známých mutací	počet AMK	funkční zapojení proteinu	patogenní mechanismy
PARK12	?	X-vázaná	LOPD	Xq21-q25	-	-	-	-	-	-
PARK13	HTRA2/OMI	AD	LOPD	2p12	8	vzácná < 1%	2	458	regulace apoptózy, molekulární chaperon	ztráta funkce
PARK14	PLA2G6	AR	NBIA EOPD + dystonie	22q13.1	17	vzácná < 1%	2	806	regulace apoptózy a zánětlivé odpovědi	ztráta funkce
PARK15	FBXO7	AR	EOPD + PP	22q12.3	9	vzácná < 1%	4	522	degradace proteinů v UPS, funkce mitochondrií, regulace buněčného cyklu a apoptózy	porucha subcelulární lokalizace, ztráta funkce
PARK16	?	?	LOPD	1q32	-	-	-	-	-	-
PARK17	VPS35	AD	LOPD	16q11.2	17	vzácná < 1%	1	796	recyklace transmembránových proteinů	porucha distribuce endozomů a jejich transportu do Golgiho aparátu
PARK18	EIF4G1	AD	LOPD	3q27.1	33	vzácná < 1%	2	1600	translace mRNA	ztráta funkce, porucha exprese genů důležitých pro buněčné přežití a růst
PARK19	DNAJC6, auxilin	AR	juvenilní PN + PP a epilepsie	1p31.3	19	raritní (2 rodiny)	2	970	klatrinem mediovaná endocytóza	ztráta funkce, porucha intracelulárního transportu
PARK20	SYNJ1, synaptojanin 1	AR	EOPD + epilepsie	21q22.11	32	raritní (3 rodiny)	1	1350	klatrinem mediovaná endocytóza	ztráta funkce, narušení synaptických vezikul

AD - autozomálně dominantní, AR - autozomálně recesivní, EOPD - early-onset Parkinsonova nemoc, LOPD - late-onset Parkinsonova nemoc, NBIA - neurodegeneration with brain iron accumulation, PN - Parkinsonova nemoc, PP - pyramidové příznaky, UPS - ubiquitin-proteazomový systém

Tabulka 2. Dělení PN a prevalence mutací

Dělení PN		Prevalence mutací
Podle rodinného výskytu	90% sporadická	3-5%
	10% familiární	až 30%
Podle vzniku onemocnění	95% s pozdním začátkem	1-3%
	3-5% s časným začátkem	20%
Podle genetické příčiny	5-10% monogenní forma	100%
	90% bez známé genetické příčiny	vliv genetických variant malého efektu

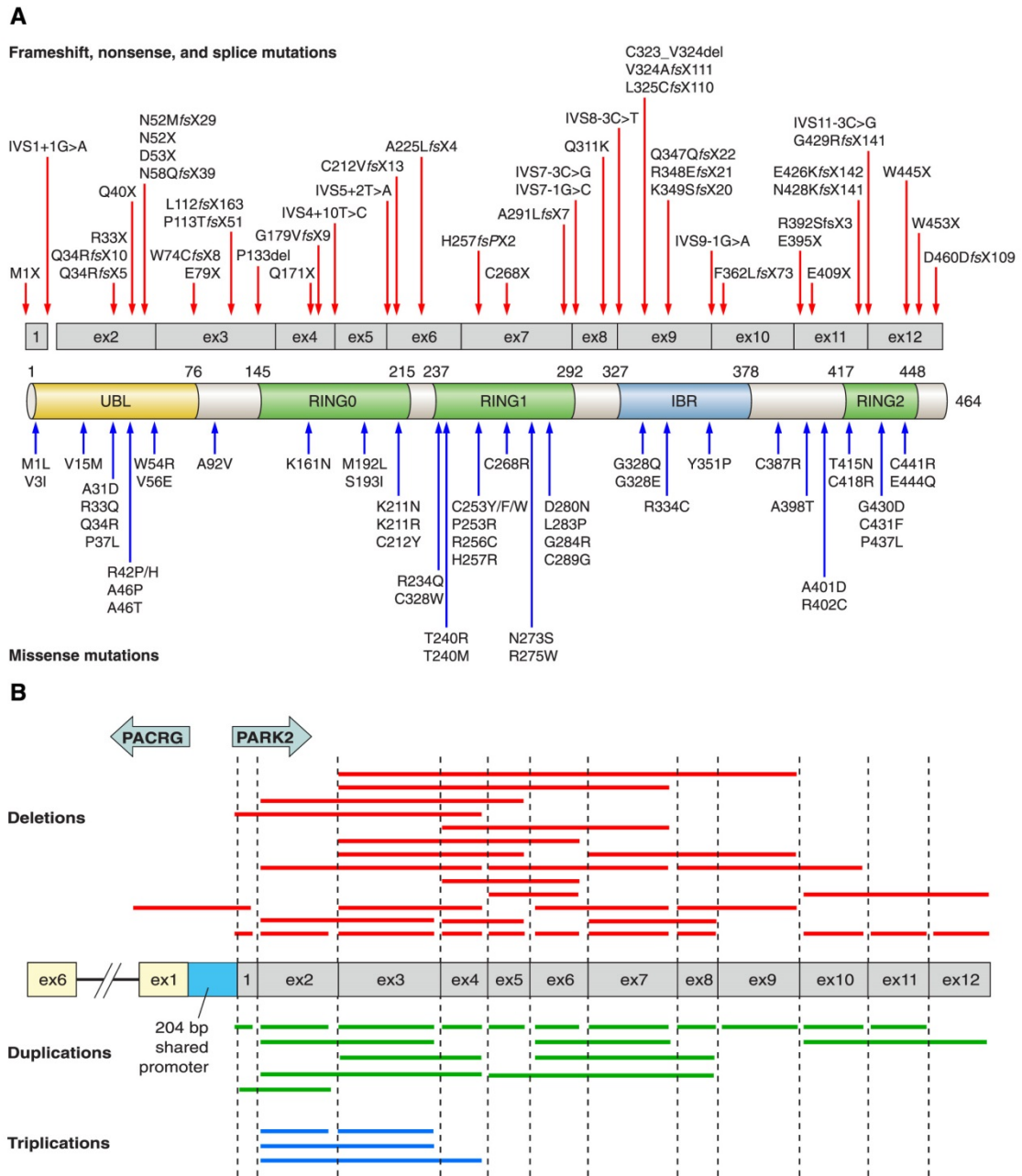
1.5. PARK2 - parkin

Genotyp a fenotyp

V roce 1998 byla u rodiny japonského původu v oblasti lokusu PARK2 nalezena mutace genu kódujícího protein parkin (chromozóm 6q26, 12 exonů, 1,38 Mb, jeden z největších genů lidského genomu) (Kitada T. et al., 1998). Dnes je známo přes 180 mutací *parkinu*, zahrnujících bodové mutace, a dále exonové delece a multiplikace, které tvoří přes 50% všech patogenních změn *parkinu* (obr. 1) (Grunewald A. et al., 2013). Frekvence mutací závisí na formě PN (sporadická x familiární), na populaci (kapitola 1.2.) a na věku při prvních projevech onemocnění (< 20 let - 68%, > 40 let - 9%) (Periquet M. et al., 2003). Výskyt mutací *parkinu* je asociován s AR přenosem PN a early-onset fenotypem. Dříve publikovaná asociace promotorového polymorfismu c.-258T>G s vyšším rizikem rozvoje EOPD nebyla recentní meta-analýzou potvrzena (Chang X.L. et al., 2011).

Řada nemocných (až 50%) má pouze jednu mutaci v heterozygotní konstituci (Klein C. et al., 2007). Předpokládá se, že přítomnost heterozygotní mutace potencuje riziko rozvoje PN a snižuje věk vzniku onemocnění (Sun M. et al., 2006). Studie využívající ¹⁸F-DOPA pozitronovou emisní tomografii (PET) ukázala u asymptomatických přenašečů heterozygotní mutace presynaptickou dopaminergní dysfunkci ve striatu (Khan N.L. et al., 2002a). Na transkraniální sonografii byl u jedinců s heterozygotní mutací pozorován hyperechogenní nálezy v SNc, který odpovídá strukturálním změnám této oblasti a je přítomen až u 90% nemocných se sporadickou PN (Hagenah J.M. et al., 2007; Walter U. et al., 2004). Na funkční magnetické rezonanci (fMRI) byly u asymptomatických heterozygotů zaznamenány odchylky v aktivitě některých oblastí motorického kortexu, zejména motorické oblasti předního cingula a dorzální premotorické kůry. Tento nálezy svědčí pro reorganizaci striatokortikální motorické dráhy vznikající pravděpodobně na podkladě latentní nigrostriální dysfunkce (Buhmann C. et al., 2005). Uvedené klinické nálezy dokládají význam heterozygotních mutací *parkinu* v patogenezi PN.

Obrázek 1. Schématické znázornění mutací *parkinu* a jejich lokalizace ve vztahu k funkčním doménám proteinu (přejato z Corti O. et al., 2011). A) bodové mutace, B) exonové delece a multiplikace.



Protein

Struktura a lokalizace

Parkin je tvořen 465 aminokyselinami (AMK). N-konec obsahuje autoregulační Ubl doménu (ubiquitin-like), která inhibuje autoubikvitinaci a tím zamezuje degradaci parkinu v UPS (Chaugule V.K. et al., 2011). Následují domény, které zajišťují vlastní enzymatickou aktivitu: dvě RING domény (Really Interesting New Gene, název odvozen od prvního popisu v roce 1993 (Lovering R. et al., 1993)), dále IBR doména (In Between RING) a na C-konci další RING doména (obr. 1) (Riley B.E. et al., 2013). Parkin je exprimován řadou tkání a je přítomen v různých intracelulárních kompartmentech, zejména pak v cytoplazmě, golgiho aparátu, endoplazmatickém retikulu, synaptických vezikulách, jádře a vnější mitochondriální membráně (Kubo S.I. et al., 2001; Kuroda Y. et al., 2006; Shimura H. et al., 1999; Stichel C.C. et al., 2000; Zarate-Lagunes M. et al., 2001).

Funkce a patogenní působení

UPS a degradace proteinů. Parkin hraje důležitou úlohu v odbourávání proteinů pomocí UPS. Má aktivitu E3 ubikvitin ligázy, enzymu, který váže ubikvitin na bílkoviny určené k degradaci v proteazomu (Shimura H. et al., 2000). Mezi jeho substráty patří např.: CDCrel-1 (cell division cycle-related protein 1) (Zhang Y. et al., 2000), Pael-R (parkin-associated endothelin receptor-like receptor) (Imai Y. et al., 2001), glykosilovaná forma alfa-synukleinu (Shimura H. et al., 2001), synphilin-1 (Chung K.K. et al., 2001), cyclin E (Staropoli J.F. et al., 2003), alfa a beta tubulin (Ren Y. et al., 2003) či p38 podjednotka aminoacyl-tRNA syntetázového komplexu (Ko H.S. et al., 2005). Nedostatečná degradace a akumulace těchto substrátů, způsobená dysfunkcí mutovaného parkinu, může vyvolat buněčné poškození a následnou apoptózu (Ko H.S. et al., 2005).

Mitochondrie. Parkin má zásadní úlohu pro stavbu a funkci mitochondrií (Schon E.A. & Przedborski S., 2011). Regulací transkripce a replikace mtDNA (mitochondriální DNA) se podílí na mitochondriální biogenezi (Kuroda Y. et al., 2006; Rothfuss O. et al.,

2009; Shin J.H. et al., 2011), ubikvitinací mitofusinu 1 a 2 ovlivňuje mitochondriální dynamiku (fúzi a štěpení) (Gegg M.E. et al., 2010; Glauser L. et al., 2011). Má také roli v transportu mitochondrií (Wang X. et al., 2011) a spolu s PINK1 (kapitola 1.5.4.) reguluje mitofagii (degradaci dysfunkčních mitochondrií) (Geisler S. et al., 2010; Narendra D. et al., 2008). Porucha mitochondriálních funkcí způsobená mutacemi parkinu a PINK1 je jednou ze základních patogenetických hypotéz vzniku EOPD (Pils A. & Winklhofer K.F., 2012).

Anti-apoptotické působení. Anti-apoptotický efekt parkinu byl prokázán jak in vitro, tak in vivo. Parkin snižuje aktivitu JNK (c-jun N-terminal kinase) a kaspázy 3, dvou důležitých mediátorů apoptózy (Machida Y. et al., 2005). Dalším mechanismem, kterým parkin přispívá k inhibici apoptózy, je ubikvitinace Pael-R, který má schopnost indukovat buněčnou smrt (Imai Y. et al., 2001; Kitao Y. et al., 2007). Reaktivace buněčného cyklu u postmitotických neuronů, jež je mediovaná cykliny, může rovněž vyvolat apoptózu (Herrup K. & Yang Y., 2007). Degradace cyklinu E za účasti parkinu buněčný cyklus inhibuje a působí tak neuroprotektivně (Staropoli J.F. et al., 2003). Parkin také zvyšuje aktivitu transkripčního faktoru NK- κ B (nuclear factor kappa B), významného induktoru anti-apoptotických genů (Henn I.H. et al., 2007).

Agregace. Různé typy mutací mohou zhoršovat rozpustnost parkinu (Hampe C. et al., 2006; Wang C. et al., 2005b). Agregáty alfa-synukleinu (Kawahara K. et al., 2008), fosforylace parkinu cyklin-dependentní kinázou 5 (CDK5) (Avraham E. et al., 2007), oxidativní stres (Wong E.S.P. et al., 2007), některé neurotoxiny či samotný dopamin (Wang C. et al., 2005a), též negativně ovlivňují jeho solubilitu. Akumulovaný, špatně rozpustný parkin, poškozuje buněčný cytoskelet, narušuje funkci UPS a tím přispívá k zániku dopaminergních neuronů (Avraham E. et al., 2007; Kawahara K. et al., 2008; Wang C. et al., 2005a; Wong E.S.P. et al., 2007).

1.6. Další geny asociované s monogenní formou Parkinsonovy nemoci

1.6.1. PARK1/4 - SNCA

Genotyp a fenotyp. V roce 1996 byl objeven první lokus pro PN - PARK1 (Polymeropoulos M.H. et al., 1996). V tomto lokusu byla u rodin italského a řeckého původu s AD PN nalezena bodová mutace p.A53T genu *SNCA*, kódující alfa-synuklein (Polymeropoulos M.H. et al., 1997). Později byly identifikovány další mutace, p.A30P (Kruger R. et al., 1998) a p.E46K (Zarranz J.J. et al., 2004), zcela recentně pak p.H50Q a p.G51D (Appel-Cresswell S. et al., 2013; Kiely A.P. et al., 2013; Proukakis C. et al., 2013). Projevy onemocnění se blíží late-onset fenotypu, mají ale časnější začátek (40 - 50 let), rychlou progresi, častá je přítomnost demence (Kasten M. & Klein C., 2013). Fenotyp mutace p.E46K odpovídá spíše demenci s Lewyho tělísky (Zarranz J.J. et al., 2004). Kromě bodových mutací jsou známy také duplikace a triplikace celého genu (původně spojeny s lokusem PARK4, jedná se však o stejný lokus jako PARK1, proto se označení PARK4 přestalo užívat) (Singleton A.B. et al., 2003). Nemocní s triplikací genu mají v průměru o 10 let časnější začátek a těžší projevy PN (demence, vegetativní dysfunkce) než pacienti s duplikacemi (Ibanez P. et al., 2004). Mutace *SNCA* jsou vzácné, nacházíme je u méně než 1% nemocných. Kromě mutací byly zachyceny též polymorfismy *SNCA*, které jsou spojovány s vyšším rizikem vzniku onemocnění (Maraganore D.M. et al., 2006; Mueller J.C. et al., 2005; Myhre R. et al., 2008).

Protein. Alfa-synuklein je za fyziologických podmínek nesbalený presynaptický protein s nízkou tendencí zaujímat specifickou sekundární strukturu (Uversky V.N. et al., 2001a). Tvoří asi 1% všech bílkovin CNS a jeho agregáty jsou hlavní součástí Lewyho tělísek (Wakabayashi K. et al., 2007). Depozita alfa-synukleinu nacházíme také u dalších neurodegenerativních onemocnění, souhrnně označovaných synukleinopatie (např. multisystémová atrofie, demence s Lewyho tělísky a další). Přesná funkce alfa-synukleinu není známa. Existují doklady o jeho vlivu na funkci vezikul, synaptickou plasticitu či metabolismus dopaminu (Clayton D.F. & George J.M., 1999; Yu S. et al., 2005).

Konformační chování alfa-synukleinu reaguje na vnější vlivy a může být modifikováno jejich změnami (Uversky V.N., 2003). V monomerním stavu dokáže původně nesbalený protein zaujímat různé sekundární struktury a má schopnost polymerizovat. Polymerizace postupuje od dimerů k morfologicky odlišným formám oligomerů a protofibril a je zakončena tvorbou nerozpustných agregátů. Agregaci indukuje zvýšená koncentrace alfa-synukleinu, změna pH či přítomnost některých kovů (Uversky V.N. et al., 2001b). Tvorba inkluzí byla prokázána také při působení organických rozpouštědel (Munishkina L.A. et al., 2003) a látek blízkých herbicidům (např. paraquat) (Manning-Bog A.B. et al., 2002). Úlohu v jejich formování má zřejmě i tkáňová transglutamináza (Junn E. et al., 2003). Fosforylace a další posttranslační modifikace alfa-synukleinu mohou rovněž ovlivnit jeho solubilitu (Smith W.W. et al., 2005). Mutace mají za následek snadnější tvorbu fibril (Greenbaum E.A. et al., 2005), kterou pozorujeme také u poruch odbourávání alfa-synukleinu v UPS a lysozomech (Vogiatzi T. et al., 2008).

Recentní studie ukazují, že alfa-synukleín má vlastnosti podobné prionům, kdy patogenní protein může indukovat konformační změny u svých fyziologických protějšků (Luk K.C. et al., 2012; Mougenot A.L. et al., 2012). Svědčí pro to nálezy v tkáních pacientů s PN, kterým byly implantovány fetální mesencefalické buňky. Postmortem analýza původně intaktních transplantovaných neuronů prokázala přítomnost Lewyho tělísek s agregáty alfa-synuleinu (Li J.Y. et al., 2008).

Která z forem alfa-synukleinu je toxická a jakým způsobem indukuje buněčnou smrt, jsou dvě klíčové otázky, na které stále neznáme detailní odpověď. Obecné mechanismy neurotoxického působení alfa-synukleinu lze shrnout do tří skupin: mechanické poškození buněčných kompartmentů, ztráta fyziologických funkcí a získání nových toxických vlastností. Tyto procesy se vzájemně nevylučují a mohou působit synergicky (Bennett M.C., 2005). Stále více dokladů nasvědčuje hypotéze, že za toxicitu alfa-synukleinu jsou zodpovědné rozpustné oligomery (protofibrily) spíše než maturované fibrily a agregáty (Goldberg M.S. & Lansbury P.T., Jr., 2000). Jsou-li oligomery

skutečně toxické, pak by formování agregátů mohlo mít ochranný efekt. Tuto úvahu podporuje studie, ve které farmakologicky indukovaná tvorba inkluzí působila neuroprotektivně (Bodner R.A. et al., 2006). Lze tedy spekulovat, že Lewyho tělíška vznikají jako výsledek snahy neuronu eliminovat toxické oligomery a nejsou příčinou, nýbrž důsledkem neurotoxicity. Kromě nitrobuňkové patologie byla toxická aktivita alfa-synukleinu prokázána také v extracelulárním prostoru, kde agregáty vyvolávají mikrogliaální aktivaci (Lee S.J., 2008).

1.6.2. PARK3

PARK 3 (chromozóm 2p13) je lokus asociovaný s AD PN a late-onset fenotypem (Gasser T. et al., 1998). Kauzální gen pro tento lokus není znám. Asociace původně navrhovaného kandidátního genu kódující sepiapterin reduktázu (SPR) (Sharma M. et al., 2006) nebyla u PN potvrzena (Sharma M. et al., 2011).

1.6.3. PARK5 - UCH-L1

Genotyp a fenotyp. Mutace p.I93M v genu kódujícím UCH-L1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1), byla identifikována v roce 1998 u sourozenců s AD PN, fenotypově blízkou sporadické late-onset formě (Leroy E. et al., 1998). Tento nález však nebyl nikdy zopakován. Dále byla popsána alelická varianta p.S18Y, jejíž asociace s PN je kontroverzní. V Japonsku je spojena s vyšším rizikem rozvoje PN (Miyake Y. et al., 2012), naopak ve švédské populaci představuje nižší riziko vzniku onemocnění (Carmine Belin A. et al., 2007).

Protein. Neuron-specifický enzym UCH-L1 tvoří 1-2% všech bílkovin mozkové tkáně a byl detekován také v Lewyho tělících (Lowe J. et al., 1990). UCH-L1 se podílí na degradaci proteinů skrze UPS. V závislosti na konformaci vykazuje dvojí enzymatickou aktivitu. V monomerní konstituci hydrolyzuje polyubikvitinové řetězce a umožňuje tak recyklaci ubikvitinu, dimer má naopak funkci ubikvitin ligázy (katalyzuje vazbu volného ubikvitinu na cílové proteiny). Monomerní forma přispívá k proteazomové degradaci alfa-synukleinu (díky zvýšenému poolu volného ubikvitinu), dimer váže

ubikvitin na alfa-synuklein pomocí vazby K63, která však nemá za následek odstranění v proteazomu, ale podporuje jeho agregaci (Liu Y. et al., 2002). Mutace p.I93M přispívá k tvorbě dimerů a potlačuje hydrolázovou aktivitu UCH-L1. Oproti tomu varianta p.S18Y kóduje protein, který nedimerizuje, akceleruje degradaci alfa-synukleinu a má protektivní antioxidační účinky (Kyratzi E. et al., 2008).

1.6.4. PARK6 - PINK1

Genotyp a fenotyp. Lokus PARK6 byl popsán v roce 2001 u rodiny s výskytem AR formy PN (Valente E.M. et al., 2001). Později byla v tomto lokusu nalezena mutace p.G309D genu kódujícího PINK1 (PTEN-induced kinase 1) (Valente E.M. et al., 2004a) a dále identifikováno přes 50 dalších genetických variant. Fenotyp zpravidla odpovídá EOPD, jsou však známy i případy s late-onset fenotypem (Gelmetti V. et al., 2008). Mutace jsou přítomny u 4-5% pacientů s familiárním výskytem early-onset PN a v 1-2% u sporadické formy onemocnění (Tan E.K. et al., 2006; Valente E.M. et al., 2004b) Význam heterozygotních mutací je předmětem diskuse (Ishihara-Paul L. et al., 2008). PET ukázala u asymptomatických heterozygotů s PINK1 mutací presynaptickou dopaminergní dysfunkci ve striatu (Khan N.L. et al., 2002b).

Protein. PINK1 je mitochondriální kináza s anti-apoptotickým vlivem jejíž aktivita byla prokázána též v Lewyho těliscích (Murakami T. et al., 2007). Spolu s parkinem (kapitola 1.4.) má zásadní úlohu v morfologii a funkci mitochondrií (Scarffe L.A. et al., 2014). PINK1 snižuje uvolňování cytochtomu c (mitochondriálního mediátoru apoptózy) a aktivaci kaspázy 3 (Petit A. et al., 2005). Řada mutací se nachází v oblasti kinázové domény PINK1 (Mills R.D. et al., 2008) a předpokládá se, že ztráta kinázové aktivity je hlavním patogenním mechanismem.

1.6.5. PARK7 - DJ-1

Genotyp a fenotyp. V roce 2001 byl v rodině s AR dědičnou PN a early-onset fenotypem popsán lokus PARK7 (van Duijn C.M. et al., 2001) a později byla v tomto lokusu identifikována bodová mutace p.L166P genu *DJ-1* (Daisuke-Junko-1) (Bonifati

V. et al., 2003). V současnosti je známo více než 15 mutací, jejichž výskyt u pacientů s EOPD nepřesahuje 1% (Hedrich K. et al., 2004; Pankratz N. et al., 2006). Role heterozygotních mutací *DJ-1* v patogenezi PN není zcela jednoznačná. U přenašečů této formy nebyla na PET zachycena patologie dopaminergního metabolismu ve striatu (Dekker M.C. et al., 2004) a zdá se, že její přítomnost nemá významnější klinický dopad.

Protein. DJ-1 byl poprvé identifikován jako onkogen (Nagakubo D. et al., 1997). Tato homodimerní bílkovina má funkci mitochondriálního antioxidantu, jehož exprese je indukována přítomností volných radikálů (ROS, z angl. reactive oxygen species) (Lev N. et al., 2008). K eliminaci ROS přispívá DJ-1 více mechanismy. Je schopen vlastní autooxidace (Kinumi T. et al., 2004), stabilizuje regulační faktor transkripce antioxidantů Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor) (Clements C.M. et al., 2006) a zvyšuje buněčnou koncentraci glutathionu (Zhou W. & Freed C.R., 2005). DJ-1 má také anti-apoptotické vlastnosti (Junn E. et al., 2005). Mutace narušují funkci DJ-1 zejména snížením jeho stability (Anderson P.C. & Daggett V., 2008). Např. mutace p.L166P mění strukturu proteinu a zabraňuje jeho dimerizaci, což vede k zvýšené degradaci DJ-1 v UPS (Gorner K. et al., 2007).

1.6.6. PARK8 - LRRK2

Genotyp a fenotyp. Lokus PARK8 byl popsán v roce 2002 u rodiny s AD dědičnou LOPD (Funayama M. et al., 2002). Později se podařilo v místě lokusu identifikovat mutace genu kódujícího protein Dardarin (název odvozen z baskického slova "dardara" znamenající třes, nyní označován jako LRRK2 - leucine rich repeat kinase 2) (Paisan-Ruiz C. et al., 2004). Dodnes bylo popsáno více než 80 genetických variant, z toho 7 patogenních (Cookson M.R., 2010; Ross O.A. et al., 2011). Fenotyp obvykle odpovídá projevům LOPD, onemocnění však může mít i časný začátek (Hedrich K. et al., 2006). Substituce p.G2019S, s penetrancí závislou na věku (50 let - 17%, 70 let - 85%), představuje vůbec nejčastější mutaci u PN (Healy D.G. et al., 2008; Kachergus J. et al., 2005). Vyskytuje se u 5-6% familiární a 1-2% sporadické formy onemocnění

(Clark L.N. et al., 2006). Její prevalence však značně kolísá v závislosti na studovaném etniku. Mezi severoafrickými Araby (Lesage S. et al., 2006) a aškenázskými Židy (Ozelius L.J. et al., 2006) ji nacházíme u pacientů v řádu desítek procent, naopak u Asiátů je záchyt mutace vzácný (Tan E.K. et al., 2005). V této populaci je ale častá přítomnost polymorfismů p.G2385R a p.R1628P, které jsou asociovány se zvýšeným rizikem vzniku PN (Farrer M.J. et al., 2007; Ross O.A. et al., 2008).

Protein. LRRK2 je multifunkční protein s kinázovou a GTPázovou aktivitou (Raquel Esteves A. et al., 2014). Studie využívající DNA čipy (microarray) našla po vyřazení *LRRK2* změnu v expresi 187 genů důležitých pro vývoj CNS, funkci axonů, buněčný cyklus ad. (Habig K. et al., 2008). LRRK2 ovlivňuje endocytózu a dynamiku vezikul (Matta S. et al., 2012), podílí se na stavbě mikrotubulů (Kett L.R. et al., 2012; Parisiadou L. & Cai H., 2010) a funkci mitochondrií (Cherra S.J., 3rd et al., 2013), reguluje odbourávání proteinů v lysozomech (Manzoni C. et al., 2013) a UPS (Lichtenberg M. et al., 2011). Má schopnost interagovat s dalšími proteiny (parkin, PINK1 a DJ-1), jenž mají úlohu v patogenezi EOPD (Venderova K. et al., 2009). Recentní studie dokládají zapojení LRRK do imunitních funkcí a zánětlivé odpovědi (Lopez de Maturana R. et al., 2014; Mutez E. et al., 2014). Exprese mutantní LRRK2 vyvolává oxidativní stres a indukuje mitochondriální apoptotickou dráhu (Iaccarino C. et al., 2007). Mutantní LRRK2 může vytvářet komplexy s chaperonem Hsp90 (heat shock protein 90), který ji stabilizuje a potencuje tak její toxický vliv (Wang L. et al., 2008). Pro patogenní působení LRRK2 je klíčová aberantní kinázová aktivita. Nejčastější mutace p.G2019S tuto aktivitu zvyšuje (Smith W.W. et al., 2006). Rovněž modifikace GTPázové aktivity, způsobená dalšími mutacemi, má význam pro patogenitu LRRK2 (Deng J. et al., 2008).

1.6.7. PARK9 - ATP13A2

Genotyp a fenotyp. V roce 2001 byla u rodiny s výskytem AR dědičného Kuforova-Rakebova syndromu (KRS) objevena asociace s lokusem PARK9 (Hampshire D.J. et al., 2001). KRS je charakterizován časným rozvojem rychle progredujícího

parkinsonského syndromu se zachovanou odpovědí na dopaminergní terapii, pyramidovou symptomatikou, supranukleární obrnou pohledu a demencí (Williams D.R. et al., 2005). Později se podařilo prokázat v lokusu PARK9 mutace genu *ATP13A2* (ATPáza typ 13A2) (Ramirez A. et al., 2006). Další studie doložila výskyt homozygotní mutace p.G504R u pacienta s juvenilní PN (= vznik onemocnění do 20 let věku) a přítomnost 2 mutací v heterozygotní konstituci u nemocných s early-onset PN (Di Fonzo A. et al., 2007). V současné době jsou známy 4 bodové mutace a duplikace celého genu (Spatola M. & Wider C., 2014).

Protein. Gen *ATP13A2* kóduje lysozomální ATPázu, jež má úlohu v odbourávání proteinů (včetně alfa-synukleinu) v lysozomech (Tsunemi T. & Krainc D., 2014; Usenovic M. et al., 2012b). Ovlivňuje také vezikulární transport (Usenovic M. et al., 2012a) a funkci mitochondrií (Grunewald A. et al., 2012). U pacientů s PN byla doložena její zvýšená aktivita v neuronech obsahující Lewyho tělíska (Ramonet D. et al., 2012). Homozygotní mutace narušují subcelulární lokalizaci a stabilitu *ATP13A2*, což má za následek její nadměrné odbourávání v UPS, heterozygotní mutace negativně ovlivňují ATPázovou aktivitu (Podhajska A. et al., 2012).

1.6.8. PARK10

V roce 2002 byl u pacientů s LOPD popsán lokus PARK10 (chromozóm 1p32) (Hicks A.A. et al., 2002). Kauzální gen není doposud znám. Recentní studie nepotvrdila u žádného genu v chromosomálním regionu PARK10 asociaci s rizikem vzniku PN (Wan J.Y. et al., 2014).

1.6.9. PARK11

Genotyp a fenotyp. V roce 2008 byly v lokusu PARK11 nalezeny mutace genu *GIGYF2* (Grb10-interacting GYF protein-2, zvaný též TNRC15 - trinucleotide repeat containing 15;) u rodin s LOPD, AD přenosem a inkompletní, věkově vázanou penetrancí (Lautier C. et al., 2008). Řada pozdějších studií však asociaci mutací *GIGYF2* s PN nepotvrdila

(Lesage S. et al., 2010; Li L. et al., 2010; Samaranch L. et al., 2010). Tento gen tedy není nadále považován za kauzální.

1.6.10. PARK12

Dalším lokusem pro LOPD je X-vázaný PARK12 (Pankratz N. et al., 2003). V tomto lokusu zatím nebyly identifikovány žádné kandidátní geny.

1.6.11. PARK13 - HTRA2/OMI

Genotyp a fenotyp. V roce 2005 byla v oblasti lokusu PARK13 objevena mutace genu *HTRA2/OMI* (high temperature requirement protein A2, nebo též Omi stress-regulated endoprotease) u pacientů se sporadickou LOPD (Strauss K.M. et al., 2005). V rozporu s tímto nálezem jsou však pozdější studie, které asociaci mutací a polymorfismů *HTRA2/OMI* s PN neprokázaly (Kruger R. et al., 2011; Simon-Sanchez J. & Singleton A.B., 2008). Původní pozorování se tedy zatím nepodařilo ověřit.

Protein. HTRA2/OMI je mitochondriální proteáza, která se vyskytuje také v Lewyho těliscích (Strauss K.M. et al., 2005). Má částečný pro-apoptický vliv (Martins L.M. et al., 2002), avšak hlavní funkce HTRA2/OMI (podobně jako u její bakteriální varianty) spočívá v podpoře buněčného přežití skrze stabilizaci důležitých bílkovin a degradaci defektních proteinů (Spiess C. et al., 1999). Byla rovněž prokázána její interakce s PINK1 (Patil K.S. et al., 2014; Plun-Favreau H. et al., 2007). PINK1 přispívá k fosforylaci HTRA2/OMI a tím podporuje její proteolytickou aktivitu, která se odráží ve zvýšené odolnosti neuronů před oxidativním stresem. V mozcích pacientů s mutací PINK1 bylo pozorováno nižší množství fosforylovaného HTRA2/OMI (Plun-Favreau H. et al., 2007). Mutace HTRA2/OMI mají za následek snížení proteolytické aktivity (Strauss K.M. et al., 2005).

1.6.12. PARK14 - PLA2G6

Genotyp a fenotyp. Ačkoli se gen *PLA2G6* (phospholipase A2, group VI) vyskytuje zejména u neurodegenerací s akumulací železa (NBIA - neurodegeneration with brain iron accumulation) (Khateeb S. et al., 2006; Morgan N.V. et al., 2006), jeho mutace byly popsány v roce 2009 také u nemocných s fenotypem blízkým EOPD, rychlou progresí, dystonií a kognitivním deficitem (Paisan-Ruiz C. et al., 2009). Postmortem analýza zachytila v mozcích pacientů Lewyho tělíska a agregáty proteinu tau, u části nemocných byla přítomna depozita železa (Paisan-Ruiz C. et al., 2012).

Protein. PLA2G6 je na kalcium nezávislá fosfolipáza, která hraje úlohu v regulaci zánětlivé odpovědi a apoptózy (Balsinde J. & Balboa M.A., 2005). Mutace PLA2G6 narušují její enzymatickou aktivitu (Gui Y.X. et al., 2013).

1.6.13. PARK15 - FBXO7

Genotyp a fenotyp. Pomocí celogenomové analýzy a následné sekvenace byla v roce 2008 identifikována u iránské rodiny mutace p.R376G v genu *FBXO7* (F-box only protein 7) (Shojaee S. et al., 2008). Později byly zachyceny mutace i u dalších národností (Di Fonzo A. et al., 2009; Paisan-Ruiz C. et al., 2010). Pacienti mají časný začátek PN, pyramidové příznaky, často bývá přítomna též deformita nohy - pes equinovarus (Deng H. et al., 2013b).

Protein. FBXO7 je ubikvitin E3 ligáza podílející se na odbourávání proteinů v UPS. Díky interakci s parkinem a PINK1 ovlivňuje degradaci mitochondrií (tzv. mitofagii) (Burchell V.S. et al., 2013). Má rovněž úlohu v regulaci buněčného cyklu (Laman H., 2006) a apoptózy (Chang Y.F. et al., 2006). Mutace působí poruchu subcelulární lokalizace a ztrátu funkce (Zhao T. et al., 2011).

1.6.14. PARK16

V celogenomových studiích byl u pacientů s LOPD popsán roku 2009 lokus PARK16 (chromozóm 1q32) (Satake W. et al., 2009; Simon-Sanchez J. et al., 2009). Kauzální gen zatím není znám.

1.6.15. PARK17 - VPS35

Genotyp a fenotyp. Metodou exomového sekvenování byla v roce 2011 objevena mutace p.D620N genu *VPS35* (vacuolar protein sorting 35) (Vilarino-Guell C. et al., 2011; Zimprich A. et al., 2011). Fenotyp odpovídá AD LOPD s inkompletní penetrancí. Výskyt mutací *VPS35* u LOPD není častý (0,1 - 1%) (Deng H. et al., 2013a).

Protein. VPS35 tvoří podjednotkou retromeru, bílkovinného komplexu, který zodpovídá za recyklaci transmembránových proteinů z endozomů do Golgiho aparátu (McGough I.J. & Cullen P.J., 2011). Mutace p.D620N má za následek redistribuci endozomů uvnitř buňky a poruchu jejich transportu do Golgiho aparátu (Follett J. et al., 2014).

1.6.16. PARK18 - EIF4G1

Genotyp a fenotyp. *EIF4G1* (eukaryotic translation initiation factor 4-gamma 1) je další gen, u kterého byly identifikovány mutace spojené s AD LOPD (Chartier-Harlin M.C. et al., 2011). Záchyt mutací je vzácný, odhaduje se na 0,02 - 0,2 % (Tucci A. et al., 2012). V mozcích nemocných byla prokázána Lewyho tělíska (Chartier-Harlin M.C. et al., 2011).

Protein. EIF4G1 je centrální komponenta proteinového komplexu EIF4F regulující translaci mRNA, jež kóduje proteiny důležité pro buněčné přežití a růst (Ramirez-Valle F. et al., 2008; Silvera D. et al., 2009). Tyto bílkoviny mají ochrannou funkci a jsou exprimovány v rámci odpovědi na různé stresové faktory. Mutace EIF4G1 jejich expresi narušuje (Chartier-Harlin M.C. et al., 2011).

1.6.17. PARK19 - DNAJC6

Genotyp a fenotyp. V letech 2012 - 2013 byly u nemocných s AR juvenilní formou PN nalezeny mutace genu *DNAJC6* (DnaJ/Hsp40 homolog, subfamily C, member 6). Součástí fenotypu jsou pyramidové příznaky, část pacientů má též generalizované epileptické záchvaty. Výskyt mutací je velmi vzácný (Edvardson S. et al., 2012; Koroglu C. et al., 2013).

Protein. Gen *DNAJC6* kóduje protein auxilin, selektivně exprimovaný v neuronech (Ahle S. & Ungewickell E., 1990). Je součástí molekulární dráhy, která zajišťuje klatrinem mediovanou endocytózu, významnou pro intracelulární transport receptorů, ligand a dalších molekul (Ungewickell E. et al., 1995). Nedostatečná funkce auxilinu má za následek poruchu endocytózy (Hirst J. et al., 2008).

1.6.18. PARK20 - SYNJ1

Genotyp a fenotyp. Posledním genem, spojeným s monogenní formou PN, je *SYNJ1* kódující synaptojanin 1. Jeho mutace p.R258Q byla zachycena v roce 2013 u pacientů iránského a italského původu. Fenotyp se částečně blíží AR EOPD, odlišuje se však rychlou progresí a nízkou odpovídavostí na dopaminergní medikaci. Součástí fenotypu mohou být další neurologické projevy, např. supranukleární paréza vertikálního pohledu, dystonie, kognitivní deficit či generalizované epileptické záchvaty. Mutace jsou raritním nálezem (Krebs C.E. et al., 2013; Quadri M. et al., 2013).

Protein. Synaptojanin 1 má enzymatickou aktivitu inositol 5-fosfatázy a podílí se (podobně jako auxilin) se na klatrinem mediované endocytóze a recyklaci synaptických vezikul (Perera R.M. et al., 2006). Nedostatečná funkce synaptojaninu 1, kterou působí též mutace p.R258Q (Krebs C.E. et al., 2013), narušuje dostupnost vezikul v nervových zakončeních (Cremona O. et al., 1999).

1.7. Geny ovlivňující riziko vzniku Parkinsonovy nemoci

Alelické varianty a polymorfismy v řadě genů mohou ovlivnit riziko vzniku PN. K jejich identifikaci přispěly zejména celogenomové asociační studie (Do C.B. et al., 2011). Stále narůstající seznam kandidátních genů je pravidelně doplňován na stránkách PDGene database - www.pdgene.org. Uvedme alespoň dva významné příklady.

Gaucherova nemoc je střádavé AR dědičné onemocnění způsobené deficitem lysozomálního enzymu glukocerebrosidázy (GBA) v jehož fenotypu bývá variabilně přítomen parkinsonský syndrom (Bembi B. et al., 2003). Studium rodin s výskytem Gaucherovy nemoci bylo jisté, že heterozygotní mutace *GBA* jsou rizikovým faktorem vzniku PN (Tayebi N. et al., 2001; Tayebi N. et al., 2003). V evropské populaci je četnost heterozygotních mutací asi 1%, u nemocných s PN frekvence dosahuje 4% (Neumann J. et al., 2009). Mezi Aškenázskými židy je tento poměr ještě výraznější, 3% populace oproti 15% pacientů (Sidransky E. et al., 2009). Heterozygotní mutace *GBA* zvyšují riziko vzniku PN více než 5x, způsobují časnější rozvoj onemocnění a výraznější, rychleji progredující kognitivní deficit (McNeill A. et al., 2012; Sidransky E. et al., 2009; Winder-Rhodes S.E. et al., 2013). U sporadické PN je deficit GBA spojen s výraznější akumulací alfa-synukleinu (Murphy K.E. et al., 2014). Pokles enzymatické aktivity GBA v mozkové tkáni osob s PN (bez ohledu na přítomnost heterozygotní mutace) podtrhuje význam lysozomální dysfunkce v patogenezi onemocnění (Gegg M.E. et al., 2012).

Gen *MAPT* (microtubule-associated protein tau) kóduje protein tau, který tvoří intracelulární neurofibrilární klubka (tangles) u tauopatií (např. frontotemporální demence, kortikobazální degenerace či progresivní supranukleární obrna) (Spillantini M.G. & Goedert M., 2013). Agregáty proteinu tau byly zachyceny také u sporadické (Braak H. et al., 2005) i familiární PN (van de Warrenburg B.P.C. et al., 2001). Genetické analýzy definovaly dva haplotypy genu *MAPT*, H1 a H2. Bylo prokázáno, že

osoby s haplotypem H1 mají zvýšené riziko rozvoje PN (Tobin J.E. et al., 2008; Zabetian C.P. et al., 2007).

1.8. Mitochondriální DNA

Mitochondriální dysfunkce je významný patogenetický mechanismus nejen u PN, ale i u dalších neurodegenerativních onemocnění (Martin L.J., 2012). Maternálně dědičná PN (resp. parkinsonský syndrom), způsobená mutacemi mitochondriálních genů, je raritním nálezem, obvykle spojeným s širší symptomatikou (např. neuropatií či myopatií) (Horvath R. et al., 2007). Řada prací poukazuje na vztah PN k specifickým haplotypům a polymorfismům mtDNA. Polymorfismus m.10398A>G v genu *ND3* (NADH dehydrogenáza 3, podjednotka komplexu I) významně snižuje riziko vzniku PN v evropské populaci (van der Walt J.M. et al., 2003), naopak vyšší pravděpodobnost rozvoje PN byla zaznamenána u jedinců s haplotypy ze skupiny JTIWX (finská populace) (Autere J. et al., 2004).

Jelikož jsou mitochondrie významným producentem ROS, dochází k poškození mtDNA poměrně často. U pacientů s PN byl doložen zvýšený počet získaných delecí mtDNA v SNc (Bender A. et al., 2006; Kraytsberg Y. et al., 2006). Opravu poškozené mtDNA zajišťuje mitochondriální DNA polymeráza gama (*POLG1*). Mutace *POLG1* se vyskytují u nemocných s progresivní externí oftalmoplegií, jež je doprovázená L-DOPA responzivním parkinsonismem a existují doklady o tom, že polymorfismy *POLG1* jsou rizikovým faktorem sporadické PN (Luoma P.T. et al., 2007).

2. Cíle a hypotézy

Cílem této práce je zmapovat fenotyp pacientů s EOPD, identifikovat možné rizikové faktory vnějšího prostředí a stanovit frekvenci výskytu polymorfismů a mutací genu *parkin* (PARK2) v souboru pacientů a kontrol. Práce má dvě části, klinickou a genetickou.

Cíle klinické části:

1. Určit charakteristické fenotypové rysy nemocných s EOPD včetně možných rozdílů fenotypu mezi pacienty s mutacemi a bez mutací *parkinu*.

Hypotézy:

- Testovaná H_{10} : fenotyp pacientů s mutacemi a bez mutací *parkinu* se neliší.
 - Alternativní H_{1A} : fenotyp pacientů s mutacemi a bez mutací se odlišuje.
2. Porovnat výskyt rizikových faktorů prostředí ve skupině pacientů a zdravých kontrol, stanovit jejich vztah k rozvoji onemocnění.

Hypotézy:

- Testovaná H_{20} : mezi nemocnými a kontrolami není rozdíl v přítomnosti rizikových faktorů vnějšího prostředí.
- Alternativní H_{2A} : existuje rozdíl mezi výskytem rizikových faktorů vnějšího prostředí u nemocných a kontrol.

Cíle genetické části:

3. Analyzovat genetické změny *parkinu* u pacientů a kontrol, porovnat jejich prevalenci v obou skupinách.

Hypotézy:

- Testovaná H_{30} : ve skupině pacientů a kontrol není rozdíl v prevalenci genetických změn *parkinu*.
- Alternativní H_{3A} : v prevalenci genetických změn *parkinu* existují mezi pacienty a kontrolami rozdíly.

3. Metodika

3.1. Pacienti a kontroly

Do studie bylo zařazeno 70 nepříbuzných pacientů (47 mužů a 23 žen) s EOPD (věk při vzniku onemocnění ≤ 40 let). Průměrný věk nemocných byl $47,4 \pm 8,4$ let. Nábor pacientů probíhal v Centru extrapyramidových onemocnění Neurologické kliniky 1. lékařské fakulty University Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze mezi roky 2007 - 2013. Všichni nemocní splňovali diagnostická kritéria PN dle UK Parkinson's Disease Society Brain Bank s výjimkou toho, že familiární výskyt PN nebyl pokládán za vylučující kritérium (Hughes A.J. et al., 1992).

Kontroly tvořilo 75 zdravých nepříbuzných osob (52 mužů, 23 žen), dobrovolných dárců krve, kteří byli do studie zařazeni v letech 2011 - 2013 z Fakultního transfuzního oddělení Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Průměrný věk kontrol činil $45,5 \pm 9,2$ let.

Písemný informovaný souhlas byl podepsán všemi pacienty a kontrolami. Nemocní i zdraví dobrovolníci byli neurologicky vyšetřeni a byl s nimi během pohovoru s lékařem vyplněn strukturovaný dotazník, zahrnující údaje o fenotypu, rizikových faktorech či rodinné anamnéze (příloha 1 a 2). Všechny kontroly měly normální neurologické vyšetření a negativní rodinnou anamnézu PN. Za pozitivní rodinnou anamnézu byla považována přítomnost PN alespoň u jednoho příbuzného 1. či 2. stupně.

Klinické vyšetření pacientů s EOPD zahrnovalo evaluaci tíže onemocnění (stupnice dle Hoehnové a Yahra, dále jen H-N), zhodnocení kognice (škála MMSE - Mini-Mental State Examination), přítomnost motorických a non-motorických příznaků (škála NMSS - Non-Motor Symptoms Scale), výskyt polékových dyskinezií a pohybových fluktuací (UPDRS IV - Unified Parkinson's Disease Rating Scale). Studie byla schválena etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze pod registračním číslem 114/09.

3.2. Genetické analýzy

3.2.1. Izolace DNA

Nemocným i kontrolám bylo odebráno 7 ml venózní krve. Genomová DNA byla izolována z periferních krevních leukocytů pomocí standardní vysolovací metody (Laitinen J. et al., 1994).

3.2.2. Analýza genetických změn *parkinu* u pacientů

Všech 12 exonů genu *parkin* bylo amplifikováno z genomové DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro PCR jsme použily mix (celkem 25 μ l) složený z dříve publikovaných primerů (Kitada T. et al., 1998) (tabulka 3) v koncentraci 0.4 mM, dále 50 ng DNA a 1x PPP Master Mix (Top-Bio), jenž obsahuje Taq DNA polymerázu a optimalizovaný reakční pufr. Reakce byly provedeny na cycleru DNA Engine Dyad (Bio-Rad). PCR produkty jsme purifikovali kitem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) podle protokolu výrobce a sekvenovali v obou směrech automatickým sekvenátorem 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) za použití reagentu Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Získané chromatogramy byly analyzovány manuálně pomocí softwaru SeqScape v2.5 (Applied Biosystems) nebo Chromas Pro v1.5 (Technelysium). Alelické varianty *parkinu* byly označeny podle referenční sekvence Genbank (accession number NM_004562.2, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004562.2).

3.2.3. Analýza genetických změn *parkinu* u kontrol

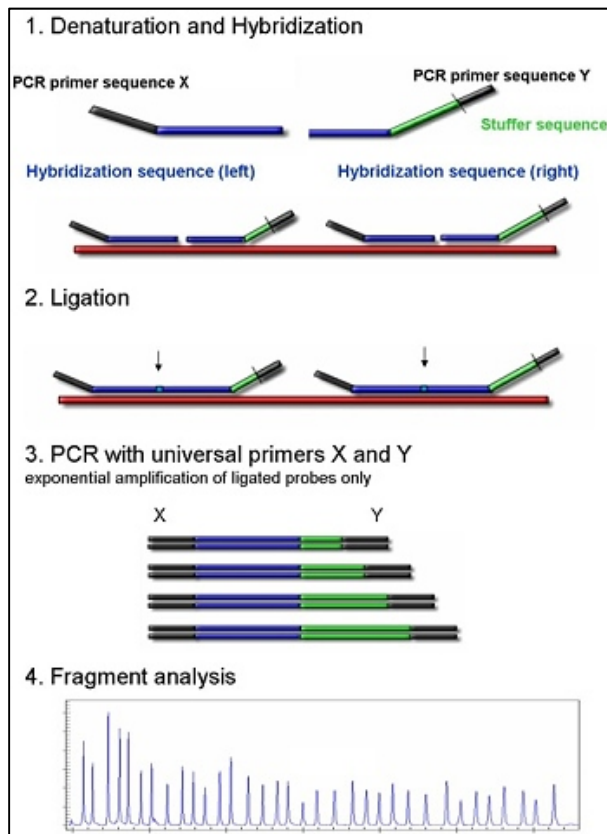
Alelické varianty *parkinu* nalezené u nemocných s EOPD byly u větší části souboru kontrol (n=45) identifikovány metodou vysokorozlišovací analýzy křivek tání (HRM - high resolution melt). Reakční mix pro PCR (celkem 10 μ l) obsahoval 1x Plain Combi Master Mix (Top-Bio), 2% DMSO (dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich), 1x LCGreen Plus (BioFire Defence), 20 ng genomové DNA a stejné primery (0.128 μ M), jenž jsme předtím použili k přípravě produktů pro sekvenování (tabulka 3). PCR byla provedena na cycleru DNA Engine Dyad (Bio-Rad). Výsledné vzorky byly analyzovány pomocí

systemu LightScanner (BioFire Defence) a získané křivky tání vyhodnoceny softwarem Call-IT v1.5 (BioFire Defence). U menšího procenta kontrolní skupiny (n=30) jsme použili metodu sekvenování shodnou s postupem uvedeným v odstavci 3.2.2.

3.2.4. Analýza exonových delecí a multiplikací *parkinu* u pacientů a kontrol

K identifikaci exonových delecí a multiplikací *parkinu* (více než 50% všech mutací) (Grunewald A. et al., 2013) jsme použili u pacientů i kontrol techniku MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification). Jde o relativně novou metodu molekulární cytogenetiky, jejíž principem je navázání oligonukleotidových sond na cílovou sekvenci DNA na základě komplementarity. Základní princip MLPA je znázorněn na obrázku 2.

Obrázek 2. Princip MLPA (přejato z www.mlpa.com)



Každá sonda se skládá ze dvou oligonukleotidů (1), po hybridizaci na cílové místo jsou oligonukleotidy spojeny ligací (2). Pouze navázané sondy jsou po denaturaci amplifikovány pomocí PCR za použití univerzálního páru primerů (3). Amplifikované sondy jsou rozděleny kapilární elektroforézou na základě jejich různé délky a následně analyzovány pomocí specializovaného softwaru (4). K provedení MLPA v naší studii jsme použili produkt SALSA MLPA kit P051-C3-0313 a P052-C2-0313

(MRC-Holland), který obsahuje sondy pro všechny exony *parkinu*. Při analýze jsme postupovali dle doporučení výrobce. DNA (50 ng) bylo denaturováno v 5 μ l 10mM pH 8 TRIS-0,1 mM EDTA pufru po dobu 5 minut při 98°C, poté byly přidány 3 μ l mixu sond a směs byla zahřívána 1 minutu na 95°C a inkubována 16 hodin při 60°C. Následně byla provedena ligace enzymem Ligase 65 při 54°C (15 minut). Ligáza byla

inaktivována zahřátím na 98°C (5 minut). Ligoaná směs (5 µl) byla smíchána s 15 µl PCR pufru a 5 µl PCR mixu (Taq polymeráza, trifosfáty deoxynukleotidů, primery) a amplifikována metodou PCR v cykleru DNA Engine Dyad (Bio-Rad). Výsledné vzorky byly analyzovány přístrojem 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) za použití softwaru Gene Mapper 4.0. Pro interpretaci fragmentů jsme použili program Coffalyser v.131211. Relativní signál pro určitou sondu byl definován jako poměr plochy peaku sondy k součtu ploch všech peaků v mixu. Normalizace byla provedena porovnáním relativních signálů vzorku s odpovídajícím relativním signálem DNA kontrolního vzorku (referenční DNA zdravého jedince). Snížení signálu na hodnoty 0,35-0,50 bylo pokládáno za delecii amplifikovaného úseku DNA na jedné alele, pokles pod 0,35 pak za delecii v obou alelách. Naopak relativní nárůst signálu představoval multiplikaci daného úseku DNA.

3.2.5. Klasifikace, patogenita a frekvence genetických změn *parkinu*

Nalezené alelické varianty *parkinu* byly klasifikovány podle terminologie Human Gene Mutation Database Professional v2013.4 (HGMD, www.hgmd.cf.ac.uk). Pro predikční analýzu patogenity bodových změn *parkinu* jsme použili softwarové nástroje MutPred (<http://mutpred.mutdb.org>) a SIFT (sorting intolerant from tolerant, <http://sift.jcvi.org>). Frekvence identifikovaných genetických změn *parkinu* v euroamerické populaci byla určena podle údajů z Exome Variant Server (EVS, <http://evs.gs.washington.edu/EVS>).

Tabulka 3. Primery použité pro analýzu genetických změn *parkinu*

Fragment	Forward primer	Reverse primer	Velikost produktu (bp)
exon 1	GCGCGGCTGGCGCCGCTGCGCGCA	GCGGCGCAGAGAGGCTGTAC	112
exon 2	CTCGTGGGTAACCTAAGTCTGT	TAATGAAGCAGTGTGGAGTAA	505
exon 3	ACATGTCACTTTTGCTTCCCT	AGGCCATGCTCCATGCAGACTGC	427
exon 4	ACAAGCTTTTAAAGAGTTTCTTGT	AGGCAATGTGTTAGTACACA	261
exon 5	ACATGTCTTAAGGAGTACATTT	TCTCTAATTTCTGGCAAACAGTG	227
exon 6	AGAGATTGTTTACTGTGGAAACA	GAGTGATGCTATTTTTAGATCCT	268
exon 7	TGCCTTTCCACACTGACAGGTACT	TCTGTTCTTCATTAGCATTAGAGA	239
exon 8	TGATAGTCATAACTGTGTGTAAG	ACTGTCTCATTAGCGTCTATCTT	206
exon 9	GGCTGAAATTTGCAGTCAGT	AATATAATCCCAGCCCATGTGCA	278
exon 10	ATTGCCAAATGCAACCTAATGTC	TTGGAGGAATGAGTAGGGCATT	165
exon 11	ACAGGGAACATAAACTCTGATCC	CAACACACCAGGCACCTTCAGA	303
exon 12	GTTTGGGAATGCGTGTTTT	AGAATTAGAAAATGAAGGTAGACA	255

3.3. Statistická analýza

V případě kategorických proměnných (výskyt genetických změn a rizikových faktorů u pacientů a kontrol) byla statistická analýza provedena pomocí Chí-kvadrát testu nebo Fisherova exaktního testu v těch případech, kde počet jedinců ve skupině byl <5. Z kontingenční tabulky bylo spočítáno odds ratio (OR) a 95% konfidenční interval (CI). U numerických proměnných jsme použili nepárový t-test. Hladina významnosti (α) byla 0,05. Statistickou analýzu jsme provedli pomocí softwaru GraphPad Prism 6.

4. Výsledky

4.1. Fenotypová charakteristika pacientů

Fenotypová charakteristika pacientů s EOPD je shrnuta v tabulce 4a - 4c.

4.1.1. Začátek, trvání, tíže a rodinný výskyt onemocnění

Průměrný věk při vzniku onemocnění činil $35,0 \pm 4,9$ let. U pacientů s mutací *parkinu* byl signifikantně nižší ($28,6 \pm 8,5$) než u nemocných bez přítomnosti mutace ($35,5 \pm 4,1$). Dva nemocní (2,9%) splňovali kritéria pro juvenilní PN (vznik nemoci ≤ 20 let), nejvíce pacientů (58,6%) mělo začátek symptomů mezi 36 - 40 lety věku. U poloviny (52,9%) začaly první příznaky vpravo, menší procento (42,9%) udávalo začátek vlevo, pouze 3 nemocní (4,3%) měli začátek symetrický. Nejčastějším prvním příznakem byla ztuhlost a pohybové zpomalení (57,1%). V polovině (50,0%) případů EOPD začala třesem. Na třetím místě udávali nemocní mezi prvními projevy bolest (15,7%), následovala změna písma (8,6%) a dystonie (7,1%). Nejméně pacientů uvedlo jako iniciální příznak poruchu chůze (2,9%). Průměrné trvání PN dosahovalo $12,3 \pm 8,0$ let, průměrná doba od začátku nemoci do stanovení diagnózy $3,4 \pm 3,4$ roku, průměrné stádium H-Y bylo $2,1 \pm 0,9$. Pozitivní rodinnou anamnézu mělo 10 (14,3%) nemocných.

4.1.2. Motorické příznaky

Téměř u všech pacientů byla přítomna rigidita (97,1%) a bradykineze (95,7%), většina trpěla rovněž třesem (85,7%). Častá byla také porucha chůze (84,3%) s průměrným rozvojem $5,2 \pm 3,4$ roku od začátku onemocnění. Mikrografií mělo 82,9% nemocných s relativně časným začátkem $3,9 \pm 4,3$ roku. U 62,1% pacientů se objevil tento příznak před stanovením diagnózy (průměr $2,2 \pm 3,4$ roky) a u 36,2% nemocných začala mikrografie v těsném intervalu před diagnózou (0 - 12 měsíců). Dysartrie byla přítomna ve dvou třetinách případů (65,7%), průměrná doba od propuknutí PN do manifestace činila $7,6 \pm 5,9$ let. Více než polovina pacientů (55,7%) rozvinula příznaky dystonie, a to průměrně do $5,2 \pm 4,5$ let. Nejčastěji byla dystonie lokalizována v oblasti dolních končetin (38,6%).

4.1.3. Non-motorické příznaky

Z non-motorických příznaků nejvíce pacientů udávalo depresivní poruchu nálady (57,1%) a hyperhidrózu (57,1%). Častá byla nadměrná denní spavost (48,6%), hypersalivace (42,9%) a insomnie (38,6%). Zhruba třetina nemocných si stěžovala na poruchu pozornosti (35,7%), více než čtvrtina pak udávala projevy ortostatické hypotenze (28,6%), sexuální obtíže (28,6%), inkontinenci moči (28,6%), obstipaci (27,1%) a obtíže při polykání (27,1%). Oslabení či ztrátu čichu pozorovalo 25,7% pacientů, subjektivní poruchu paměti a zapomínání referovalo 24,3% nemocných. Průměrné MMSE bylo $28,7 \pm 1,6$. Pětina pacientů trpěla bolestmi (20,0%), o něco méně popisovalo vizuální halucinace (18,6%).

4.1.4. Komplikace, fluktuace hybnosti a polékové dyskineze

Freezing a hesitace byly přítomny v polovině (52,9%) a posturální instabilita s pády ve čtvrtině (25,7%) případů. Průměrná doba od začátku PN do rozvoje freezingů a hesitací byla $9,1 \pm 4,4$ let, respektive $11,6 \pm 6,1$ let u pádů. Wearing-off (vyčerpání účinku dopaminergní medikace, zhoršení stavu na konci dávky) udávalo 70,0% pacientů s průměrným nástupem $4,7 \pm 4,1$ roku od zahájení léčby. Dyskineze na vrcholu dávky (peak-of-dose) měla polovina nemocných (51,4%), průměrná doba od nasazení medikace do manifestace dyskinezi činila $5,2 \pm 4,0$ let. Sleep benefit (zlepšení motorických příznaků po vyspání) popisovala rovněž polovina pacientů (50,0%).

4.1.5. Léčba

Výbornou odpovídavost na dopaminergní léčbu na začátku onemocnění udávaly více než dvě třetiny nemocných (68,6%). Prvním nasazeným lékem byla nejčastěji L-DOPA (35,7%), následovali dopaminergní agonisté (28,6%), inhibitory monoaminoxydázy B (11,4%) a anticholinergika (10,0%). U 14,3% případů byla použita jiná iniciální léčba (amantadin, clonazepam, trimepranol apod.). Doba od začátku nemoci do zahájení dopaminergní medikace činila $3,5 \pm 2,5$ roku. L-DOPA užívalo 78,6% pacientů, průměrná denní dávka byla $726,2 \pm 367,1$ mg. Přes dvě třetiny nemocných mělo nasazeno

dopaminergní agonisty (68,6%), hluboká mozková stimulace byla implantována v necelé třetině případů (30,0%).

Tabulka 4a. Fenotypová charakteristika pacientů s EOPD (n=70)

<i>fenotypová charakteristika</i>	<i>hodnoty</i>	
Základní charakteristika souboru		
Průměrný věk (roky)	47,4 ± 8,4	
Pohlaví (muži / ženy)	47 (67,1%) / 23 (32,9%)	
Lateralita (praváci / leváci / ambidextři)	69 (98,6%) / 0 (0,0%) / 1 (1,4%)	
Charakteristika vzniku, trvání, tíže a rodinného výskytu PN, kognice		
Věk při prvních projevech PN (roky)	35,0 ± 4,9	
Začátek PN 36 - 40 let	41 (58,6%)	
Začátek PN 31 - 35 let	19 (27,1%)	
Začátek PN 26 - 30 let	6 (8,6%)	
Začátek PN 21 - 25 let	2 (2,9%)	
Začátek PN ≤ 20 let (juvenilní PN)	2 (2,9%)	
Pacienti s mutací (n=5)	28,6 ± 8,5	p = 0.0019
Pacienti bez mutace (n=65)	35,5 ± 4,1	
Začátek PN vpravo	37 (52,9%)	
Začátek PN vlevo	30 (42,9%)	
Začátek PN symetricky	3 (4,3%)	
Trvání PN (roky)	12,3 ± 8,0	
Doba od začátku PN do určení diagnózy (roky)	3,4 ± 3,4	
Stádium H-Y	2,1 ± 0,9	
MMSE	28,7 ± 1,6	
Pozitivní rodinná anamnéza PN	10 (14,3%)	
První příznaky PN		
Ztuhlost a pohybové zpomalení (rigidita a bradykineze)	40 (57,1%)	
Třes	35 (50,0%)	
Bolest	11 (15,7%)	
Změna písma	6 (8,6%)	
Dystonie	5 (7,1%)	
Porucha chůze	2 (2,9%)	

Tabulka 4b. Fenotypová charakteristika pacientů s EOPD (n=70)

<i>fenotypová charakteristika</i>	<i>hodnoty</i>
Motorické příznaky	
Rigidita	68 (97,1%)
Bradykineze	67 (95,7%)
Třes	60 (85,7%)
Porucha chůze	59 (84,3%)
- Doba od začátku PN do rozvoje poruchy chůze (roky)	5,2 ± 3,4
Mikrografie	58 (82,9%)
- Doba od začátku PN do rozvoje mikrografie (roky)	3,9 ± 4,3
Dysartrie	46 (65,7%)
- Doba od začátku PN do rozvoje dysartrie (roky)	7,6 ± 5,9
Dystonie	39 (55,7%)
Blefarospasmus	1 (1,4%)
Cervikální dystonie	2 (2,9%)
Dystonie horních končetin	13 (18,6%)
Grafospasmus	3 (4,3%)
Dystonie dolních končetin	27 (38,6%)
Dystonie trupu	2 (2,9%)
- Doba od začátku PN do rozvoje dystonie (roky)	5,2 ± 4,5
Non-motorické příznaky (referované)	
Deprese	40 (57,1%)
Hyperhidróza	40 (57,1%)
Nadměrná denní spavost	34 (48,6%)
Hypersalivace	30 (42,9%)
Insomnie	27 (38,6%)
Porucha pozornosti	25 (35,7%)
Ortostatická hypotenze	20 (28,6%)
Sexuální obtíže	20 (28,6%)
Inkontinence moči	20 (28,6%)
Obstipace	19 (27,1%)
Obtíže při polykání	19 (27,1%)
Oslabení či ztráta čichu	18 (25,7%)
Porucha paměti, zapomínání	17 (24,3%)
Bolest	14 (20,0%)
Vizuální halucinace	13 (18,6%)

Tabulka 4c. Fenotypová charakteristika pacientů s EOPD (n=70)

<i>fenotypová charakteristika</i>	<i>hodnoty</i>
Komplikace, dyskineze a fluktuace hybnosti	
Freezing a hesitace	37 (52,9%)
- Doba od začátku PN do rozvoje freezingů a hesitací (roky)	9,1 ± 4,4
Posturální instabilita s pády	18 (25,7%)
- Doba od začátku PN do rozvoje pádů (roky)	11,6 ± 6,1
Wearing-off	49 (70,0%)
- Doba od zahájení medikace do vzniku wearing-off (roky)	4,7 ± 4,1
Dyskineze na vrcholu dávky	36 (51,4%)
- Doba od zahájení medikace do vzniku dyskinezí (roky)	5,2 ± 4,0
Sleep benefit	35 (50,0%)
Léčba	
Výborná odpovídavost na léčbu na začátku PN	48 (68,6%)
První nasazená léčba - L-DOPA	25 (35,7%)
První nasazená léčba - agonista dopaminu	20 (28,6%)
První nasazená léčba - inhibitor monoaminoxidázy B	8 (11,4%)
První nasazená léčba - anticholinergikum	7 (10,0%)
První nasazená léčba - jiná	10 (14,3%)
- Doba od začátku PN do zahájení dopaminergní léčby (roky)	3,5 ± 2,5
Medikace L-DOPA	55 (78,6%)
- Dávka L-DOPA (mg / den)	726,2 ± 367,1
Medikace agonistou dopaminu	48 (68,6%)
Hluboká mozková stimulace	21 (30,0%)

4.2. Rizikové faktory u pacientů a kontrol

4.2.1. Kouření

V době studie aktivně kouřilo 15,7% pacientů a 18,7% kontrol (tabulka 5). Pět a více cigaret po dobu nejméně pěti let před začátkem PN kouřilo 34,3% nemocných, průměrná doba kouření před rozvojem PN byla $12,8 \pm 5,0$. Stejná kritéria, ovšem bez vztahu k onemocnění, splňovalo 25,3% kontrol. Průměrný počet cigaret vykouřených za den se mezi těmito skupinami nelišil (tabulka 5) a nebylo prokázáno, že by kouření ovlivňovalo riziko rozvoje PN (tabulka 6).

4.2.2. Pití kávy

Pravidelné pití kávy udávalo 47,1% pacientů a 77,3% zdravých dobrovolníků, bez signifikantního rozdílu v počtu vypitých šálek za den (tabulka 5). Příjem kávy byl spojen se statisticky významným snížením rizika výskytu PN (tabulka 6).

4.2.3. Práce v zemědělství a expozice chemikáliím

Práci v zemědělství a expozici pesticidům či dalším chemikáliím po dobu více než jednoho roku referovalo 28,6% nemocných a 6,7% kontrol (tabulka 5). Tento faktor představoval signifikantně vyšší riziko vzniku PN (tabulka 6).

Tabulka 5. Rizikové faktory u pacientů (n=70) a kontrol (n=75)

<i>rizikový faktor</i>	<i>hodnoty</i>	
Kouření		
Pacienti - aktivní kuřáci	11 (15,7%)	
Průměrný počet cigaret / den	10,0 ± 6,6	
Průměrná doba kouření (roky)	18,6 ± 10,7	
Kontroly - aktivní kuřáci	14 (18,7%)	
Průměrný počet cigaret / den	10,0 ± 6,4	
Průměrná doba kouření (roky)	22,6 ± 11,0	
Pacienti - před začátkem PN ≥ 5 cigaret / den po dobu ≥ 5 let	24 (34,3%)	
Průměrný počet cigaret / den	15,7 ± 11,3	} p = 0,98
Průměrná doba kouření před začátkem PN (roky)	12,8 ± 5,0	
Kontroly - kouření ≥ 5 cigaret / den po dobu ≥ 5 let	19 (25,3%)	
Průměrný počet cigaret / den	15,6 ± 10,1	
Průměrná doba kouření (roky)	22,6 ± 11,0	
Pití kávy		
Pacienti	33 (47,1%)	
Průměrný počet šálek / den	1,7 ± 1,1	} p = 0,07
Kontroly	58 (77,3%)	
Průměrný počet šálek / den	2,2 ± 1,2	
Práce v zemědělství a expozice chemikáliím		
Pacienti ≥ 1 rok před začátkem PN	20 (28,6%)	
Kontroly ≥ 1 rok	5 (6,7%)	

Tabulka 6. Rizikové faktory, statistické srovnání u pacientů (n=70) a kontrol (n=75)

Rizikový faktor	Výskyt u pacientů	Výskyt u kontrol	Hodnota <i>p</i>	OR	95% CI
Kouření ≥ 5 cigaret / den po dobu ≥ 5 let	24 (34,3%)	19 (25,3%)	0,2382	1,54	0,75 - 3,15
Pití kávy	33 (47,1%)	58 (77,3%)	0,0002	0,26	0,13 - 0,53
Práce v zemědělství a expozice chemikáliím ≥ 1 rok	20 (28,6%)	5 (6,7%)	0,0007	5,60	1,97 - 15,93

CI - konfidenční interval, OR - odds ratio

4.3. Alelické varianty *parkinu* u pacientů a kontrol

Přehled genotypu pacientů a kontrol uvádí tabulka 7, četnost jednotlivých genetických změn *parkinu* je znázorněna v tabulce 8.

Polymorfismus p.S167N (obrázek 3) byl identifikován v podobném procentu u pacientů (7,1%) jako u kontrol (9,3%), stejně tomu bylo v případě polymorfismu p.D394N (obrázek 4), který mělo 10,0% nemocných a 8,0% kontrol. Četnost polymorfismu p.V380L (obrázek 5) byla téměř dvakrát vyšší mezi kontrolami (25,3%) než mezi pacienty (14,3%). U jednoho pacienta (1,4%) a dvou kontrol (2,7%) byl zaznamenán výskyt dvou polymorfismů najednou (pacient 2 a kontrola 1: p.S167N + p.D394N, kontrola 2: p.S167N + p.V380L, tabulka 7).

U jedné kontroly (1,3%) jsme našli novou alelickou variantu p.V380I (c.1138G>A) (obrázek 6) spolu s polymorfismem p.D394N. Varianta p.A82E (uvedená v HGMD jako mutace vyvolávající nemoc) (obrázek 7) byla přítomna u jednoho pacienta (1,4%), který měl rovněž polymorfismus p.D394N. Další alelická varianta p.R402C (v HGMD opět uvedená jako mutace vyvolávající nemoc) (obrázek 8) se vyskytovala mezi pacienty v jednom případě (1,4%) a byla také zaznamenána u jedné kontroly (1,3%), kde jsme zároveň identifikovali polymorfismus p.V380L (tabulka 7, kontrola 4).

Mutace *parkinu* jsme našli u pěti pacientů (7,1%), z nichž jeden (1,4%) měl bodovou mutaci p.R334C (obrázek 9) a zbylí čtyři (5,7%) exonové delece různého rozsahu. Na obrázku 10 je znázorněn výsledek z analýzy MLPA, delece exonu 2-5 u pacienta 26 (tabulka 7).

Všechny alelické varianty byly pozorovány v heterozygotní konstituci, kromě dvou homozygotních polymorfismů (p.V380L u pacienta 17 a p.S167N u kontroly 2, tabulka 7) a homozygotní delece exonu 4. Pacient s touto delecí měl pozitivní rodinnou anamnézu a byl též heterozygot pro deleci exonu 2-3 a polymorfismus p.V380L

(tabulka 7, pacient 3). Při porovnání souboru pacientů a kontrol nebyl v četnosti nalezených polymorfismů, alelických variant a mutací prokázán statisticky významný rozdíl (tabulka 8).

Tabulka 7. Genotypová charakteristika pacientů a kontrol

Proband	Genetická změna <i>parkinu</i>	Pozitivní rodinná anamnéza
Pacient 1	p.A82E het + p.D394N het	-
Kontrola 1 Pacient 2	p.S167N het + p.D394N het	-
Pacient 3	p.V380L het + ex2-3del het + ex4del hom	+
Kontrola 2	p.S167N hom + p.V380L het	-
Kontrola 3	p.V380I het + p.D394N het	-
Kontrola 4	p.V380L het + p.R402C het	-
Pacient 4-7 Kontrola 5-10	p.S167N het	Pacient 4
Pacient 8	p.R334C het	-
Pacient 9-16 Kontrola 11-26	p.V380L het	Pacient 9,10
Pacient 17	p.V380L hom	-
Pacient 18-22 Kontrola 27-30	p.D394N het	-
Pacient 23	p.R402C het	-
Pacient 24	ex2del het	-
Pacient 25	ex1-2del het	-
Pacient 26	ex2-5del het	-

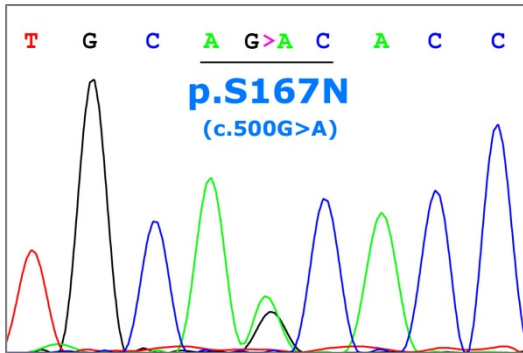
het - heterozygotní, hom - homozygotní

Tabulka 8. Četnost genetických změn *parkinu* u pacientů (n=70) a kontrol (n=75)

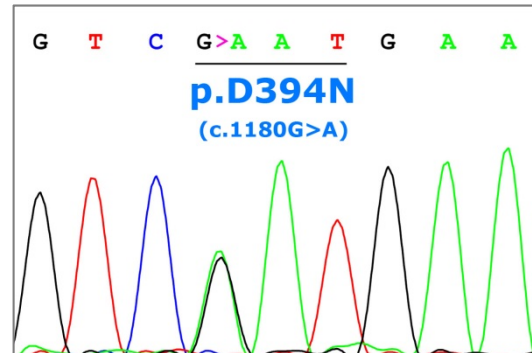
Genetická změna	Zygozita	Klasifikace dle HGMD	Predikce patogenity SIFT / MutPred	Výskyt dle EVS	Výskyt u pacientů	Výskyt u kontrol	Hodnota p	OR	95% CI
Bodové změny									
p.A82E	het	M	tolerované / nízké riziko	0,51%	1 (1,4%)	0 (0,0%)	0,489	3,26	0,13 - 81,40
p.S167N	het	P	tolerované / velmi nízké riziko	3,74%	5 (7,1%)	6 (8,0%)	1,0	0,89	0,26 - 3,04
p.S167N	hom	M	tolerované / velmi nízké riziko	0,05%	0 (0,0%)	1 (1,3%)	1,0	0,35	0,01 - 8,80
p.R334C	het	M	tolerované / střední riziko	NA	1 (1,4%)	0 (0,0%)	0,483	3,26	0,13 - 81,40
p.V380L	het	P	tolerované / velmi nízké riziko	28,51%	9 (12,9%)	19 (25,3%)	0,062	0,44	0,18 - 1,04
p.V380L	hom	P	tolerované / velmi nízké riziko	2,84%	1 (1,4%)	0 (0,0%)	0,483	3,26	0,13 - 81,40
p.V380I	het	NA	tolerované / nízké riziko	NA	0 (0,0%)	1 (1,3%)	1,0	0,35	0,01 - 8,80
p.D394N	het	P	tolerované / velmi nízké riziko	8,53%	7 (10,0%)	6 (8,0%)	0,775	1,28	0,40 - 4,01
p.R402C	het	M	poškozující / vysoké riziko	0,51%	1 (1,4%)	1 (1,3%)	1,0	1,07	0,07 - 17,49
Exonové delece									
Ex1del	het	M	NA	NA	1 (1,4%)	0 (0,0%)	0,483	3,26	0,13 - 81,40
Ex2del	het	M	NA	NA	4 (5,7%)	0 (0,0%)	0,052	10,22	0,54 - 193,50
Ex3del	het	M	NA	NA	2 (2,9%)	0 (0,0%)	0,231	5,51	0,26 - 116,90
Ex4del	het	M	NA	NA	1 (1,4%)	0 (0,0%)	0,483	3,26	0,13 - 81,40
Ex4del	hom	M	NA	NA	1 (1,4%)	0 (0,0%)	0,483	3,26	0,13 - 81,40
Ex5del	het	M	NA	NA	1 (1,4%)	0 (0,0%)	0,483	3,26	0,13 - 81,40

CI - konfidenční interval, EVS - Exome variant server, het - heterozygotní, HGMD - Human gene mutation database, hom - homozygotní, M - mutace vyvolávající nemoc, NA - není dostupné, OR - odds ratio, P - polymorfismus asociovaný s nemocí, SIFT - sorting intolerant from tolerant

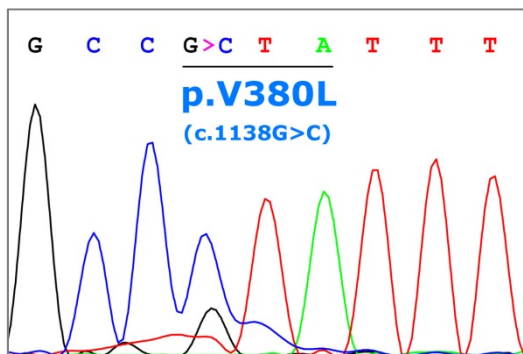
Obrázek 3. Chromatogram polymorfismu p.S167N



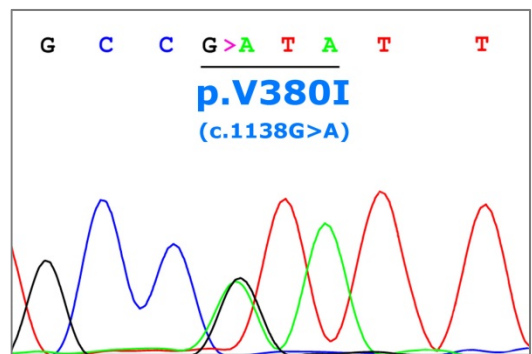
Obrázek 4. Chromatogram polymorfismu p.D394N



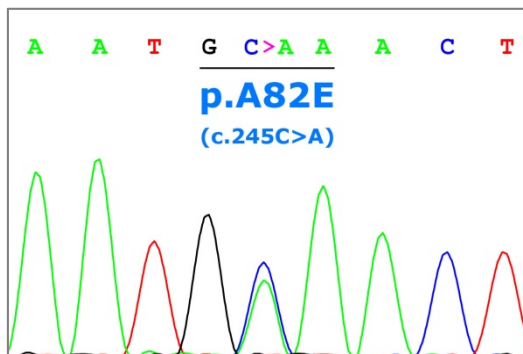
Obrázek 5. Chromatogram polymorfismu p.V380L



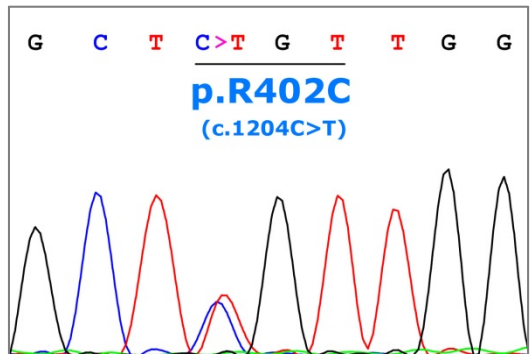
Obrázek 6. Chromatogram alelické varianty p.V380I



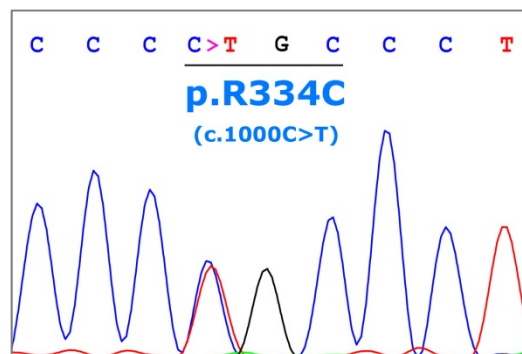
Obrázek 7. Chromatogram alelické varianty p.A82E



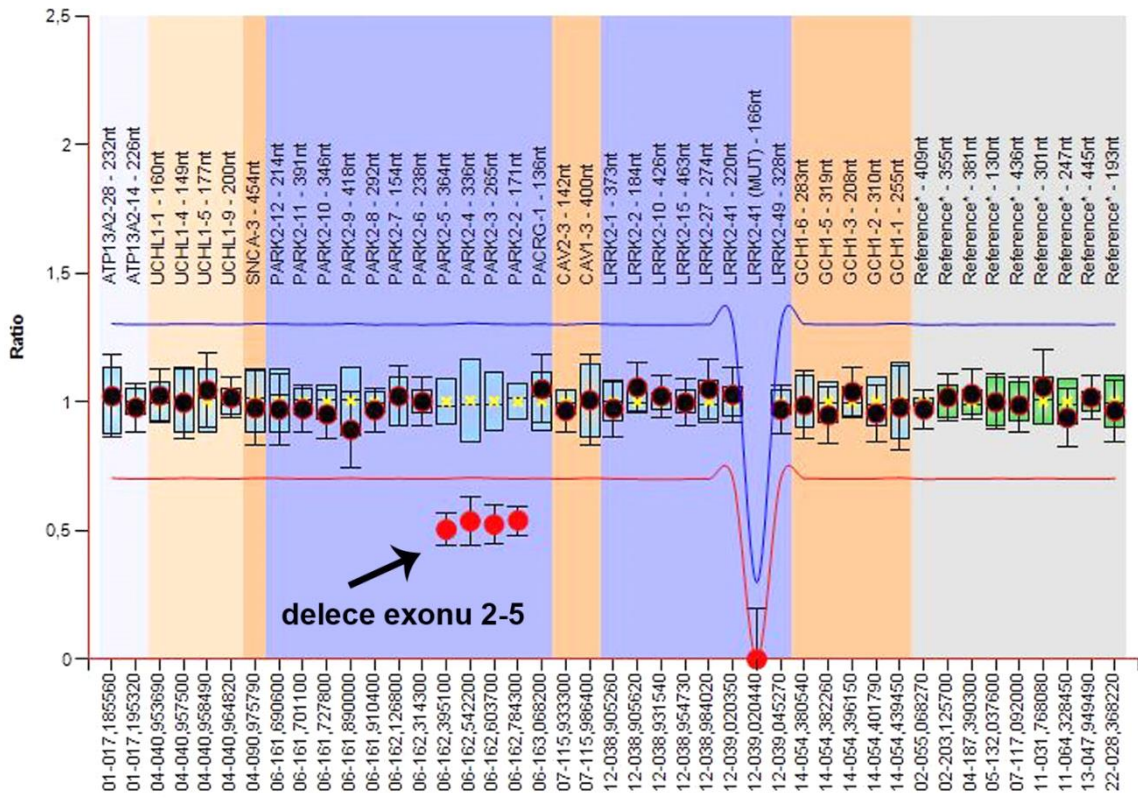
Obrázek 8. Chromatogram alelické varianty p.R402C



Obrázek 9. Chromatogram mutace p.R334C



Obrázek 10. MLPA analýza, heterozygotní delece exonu 2-5



4.4. Testování hypotéz

Hypotéza H_{10} (fenotyp pacientů s mutacemi a bez mutací *parkinu* se neliší) byla zamítnuta, neboť byl prokázán signifikantní rozdíl ve věku při začátku EOPD u pacientů s mutacemi a bez mutací (tabulka 4a)

Rovněž hypotéza H_{20} (mezi nemocnými a kontrolami není rozdíl v přítomnosti rizikových faktorů vnějšího prostředí) byla zamítnuta vzhledem k statisticky významným rozdílům v četnosti pití kávy a v prevalenci práce v zemědělství a s chemikáliemi (tabulka 6).

Hypotézu H_{30} (ve skupině pacientů a kontrol není rozdíl v prevalenci genetických změn *parkinu*) se zamítnout nepodařilo (tabulka 8).

5. Diskuse

5.1. Fenotyp

Fenotypová charakteristika našeho souboru pacientů s EOPD z velké části odpovídá předchozím studiím v jiných populacích (Giovannini P. et al., 1991; Khan N.L. et al., 2003; Kim H.J. et al., 2011; Lohmann E. et al., 2003; Lohmann E. et al., 2009; Schrag A. et al., 1998; Spica V. et al., 2013). Významné fenotypové rysy a jejich odlišnosti oproti dříve publikovaným pracím jsou diskutovány níže.

5.1.1. Začátek onemocnění, diagnóza

Průměrný věk na začátku EOPD činil $35,0 \pm 4,9$ let, počet nemocných však výrazně rostl se stoupajícím věkem při manifestaci prvních příznaků. Vznik onemocnění před 21. rokem života (juvenilní PN) byl zaznamenán ve dvou případech (2,9%), stejný počet nemocných měl první projevy PN v intervalu 21 - 25 let. Začátek nemoci mezi 26 - 30 lety byl zaznamenán u 6 pacientů a v rozmezí 31 - 35 let se nacházelo již 19 nemocných (27,1%). Většina případů (41; 58,6%) pak měla začátek PN mezi 36 - 40 lety (tabulka 4a). Toto pozorování odpovídá předchozím epidemiologickým údajům, dokumentujícím nárůst prevalence a incidence PN s věkem (Bower J.H. et al., 1999; de Lau L.M. & Breteler M.M., 2006; Van Den Eeden S.K. et al., 2003). Věk tak představuje významný rizikový faktor rozvoje PN (Kiebertz K. & Wunderle K.B., 2013).

Průměrný věk při vzniku EOPD byl signifikantně nižší u pacientů s mutacemi než u nemocných bez mutací. To odpovídá pozorování, že mutace *parkinu* urychlují začátek nemoci (Grunewald A. et al., 2013; Kim H.J. et al., 2011; Sun M. et al., 2006) a pravděpodobnost jejich záchytu negativně koreluje s věkem na začátku onemocnění (Periquet M. et al., 2003). Vzhledem k malému počtu nemocných s mutacemi (n=5) jsme další srovnání fenotypových rozdílů osob s mutacemi a bez nich neprováděli. Kromě časnějšího vzniku EOPD u nemocných s mutacemi, studie rozsáhlejších souborů pacientů signifikantní rozdíly fenotypu mezi těmito dvěma skupinami nenalezly (Kim H.J. et al., 2011; Lohmann E. et al., 2009).

Hlavní příznaky PN, rigidita, bradykineze a třes byly nejčastějšími symptomy na začátku onemocnění. Vzhledem k tomu, že nemocní často referují rigiditu a bradykinezi souhrnně pojmem „neobratnost“ či „ztuhlost“, hodnotili jsme tyto fenomény na počátku nemoci jako jeden projev (tabulka 4a). U nezanedbatelného procenta nemocných (15,7%) byla iniciálním symptomem bolest. Tento atypický projev začátku EOPD byl popsán také v několika dalších studiích (Kann M. et al., 2002; Sekeff-Sallem F.A. & Barbosa E.R., 2007), proto by se na něj mělo během klinické diagnostiky myslet. Rovněž dystonie může být prvním příznakem EOPD, v našem souboru tomu tak bylo v 7 procentech. Při analýze fenotypu 24 nemocných s mutacemi *parkinu*, pozoroval Khan et al. výskyt dystonie na počátku EOPD dokonce u 41% případů (Khan N.L. et al., 2003). Tato práce navíc popsala výskyt psychiatrických projevů (deprese, úzkost, sebepoškození) před samotným rozvojem hybných příznaků. V naší studii jsme však psychiatrické symptomy před začátkem hybných projevů nesledovali. Porucha chůze je u EOPD vzácným iniciálním příznakem (Wickremaratchi M.M. et al., 2009) a byla na začátku nemoci přítomna pouze u dvou (2,9%) pacientů.

Charakteristický asymetrický rozvoj příznaků, který je jedním z podpůrných diagnostických kritérií PN (Hughes A.J. et al., 1992), měla většina našich nemocných (95,7%). Přestože téměř všichni byli praváci (98,6%), pravostranný začátek onemocnění byl registrován pouze v polovině případů (52,9%). Tyto výsledky nasvědčují hypotéze, že lateralita nemá zásadní vliv na stranu, kde se objeví první příznaky PN (Stochl J. et al., 2009).

Průměrnou dobu od začátku PN do určení diagnózy (3,4 roku) lze považovat za relativně uspokojivý výsledek, zejména v porovnání s diagnostickou prodlevou u jiných extrapyramidových onemocnění. Například Touretteův syndrom (tiková nemoc) je v ČR diagnostikován až s dvou a půl násobným zpožděním (8,5 let) (Fiala O. & Ruzicka E., 2003). Na druhou stranu recentní studie z Velké Británie uvádí průměrný interval do stanovení diagnózy 11 měsíců, což je téměř o 2,5 roku méně. Tato práce

však hodnotila diagnostiku LOPD (věk při vzniku nemoci byl 66 - 73 let), je tedy možné, že na diagnostické prodlevě pacientů EOPD má podíl odlišný fenotyp onemocnění. Zejména časný začátek nemoci spojený s atypickými příznaky (bolest, dystonie, psychiatrické projevy) může činit diagnostické obtíže, což dosvědčují výsledky kanadských autorů, kteří u EOPD pozorovali 15 měsíční zpoždění ve stanovení diagnózy oproti LOPD (Rana A.Q. et al., 2012). V jejich skupině byli nemocní s EOPD diagnostikováni v průměru do 26 měsíců, tedy o 14 měsíců dříve, než tomu bylo v našem souboru.

5.1.2. Motorické příznaky

Téměř všichni nemocní (>95%) měli během vyšetření známky rigidity a bradykineze, u většiny (85%) byl přítomen rovněž třes. Lehce nižší procento třesu oproti rigiditě a bradykinezi je poměrně konstantním obrazem EOPD (Khan N.L. et al., 2003; Kim H.J. et al., 2011; Lohmann E. et al., 2003).

Pátým nejčastějším hybným příznakem byla mikrografie (82,9%), šest nemocných (8,6%) ji pak uvedlo jako iniciální příznak. Průměrná doba od začátku PN do rozvoje mikrografie byla 3,9 roku, což je hodnota blízká průměrné době do určení diagnózy (3,4 roku). Ze všech pacientů s mikrografií se u 62,1% objevila porucha písma před stanovením diagnózy (průměr $2,2 \pm 3,4$ roky) a u 36,2% se mikrografie vyskytla v krátkém intervalu před diagnózou (0 - 12 měsíců). Mikrografie je poměrně nápadný hendikep, lze tedy spekulovat, že u části nemocných představuje zlomový bod, kdy se rozhodnou se svými obtížemi vyhledat lékaře.

Charakteristickým projevem EOPD je častý výskyt dystonie. V našem souboru ji měla více než polovina pacientů (55,7%), což odpovídá výsledkům většiny dalších studií (Grunewald A. et al., 2013; Kann M. et al., 2002; Lohmann E. et al., 2009; Lucking C.B. et al., 2000). Lokalizace dystonie vykazovala zjevný kраниокаудální gradient, nejvíce nemocných mělo dystonii dolních končetin, nejméně pak v oblasti hlavy a krku (tabulka 4b). V tomto ohledu je zajímavá podobnost fenotypu EOPD s fenotypem dopa-

responzivní dystonie (DRD), u které se rovněž mohou manifestovat projevy parkinsonského syndromu (Lee W.W. & Jeon B.S., 2014). Obě nemoci spojuje řada klinických rysů: časný začátek, převaha výskytu dystonie na dolních končetinách či odpovídavost příznaků na L-DOPA. U DRD bývají přítomny diurnální fluktuace a zlepšení hybnosti po vyspání, které pozorují často i nemocní s EOPD (tzv. sleep benefit). Diferenciální diagnostika těchto dvou onemocnění může být proto v některých případech poměrně komplikovaná (Tassin J. et al., 2000).

5.1.3. Non-motorické příznaky

Typickým znakem EOPD jsou dlouhou dobu neporušené kognitivní funkce (Grunewald A. et al., 2013; Schrag A. & Schott J.M., 2006), což platilo i v případě našich pacientů (průměrné MMSE $28,7 \pm 1,6$), přestože subjektivní pocit zhoršené paměti a zapomínání udávala až čtvrtina nemocných. K častým neuropsychiatrickým projevům EOPD patří deprese (Kostic V.S. et al., 1994). Její prevalence se pohybuje mezi 40 - 50% (Kim H.J. et al., 2011; Lohmann E. et al., 2009; Spica V. et al., 2013; Srivastava A. et al., 2011), v našem souboru udávalo depresivní poruchu nálady dokonce 57% pacientů. Jednalo se však o referovaný údaj, který se může lišit od objektivního pozorování. Stejně procento nemocných si stěžovalo na hyperhidrózu, častý projev autonomní dysregulace u PN (Swinn L. et al., 2003).

Ohledně hyposmie, jež má nejméně 75% pacientů s LOPD (Haehner A. et al., 2009) a která může o několik let předcházet rozvoji hybných projevů (Ross G.W. et al., 2008), panují u EOPD neshody. Původní studie z roku 2004 doložila zhoršení čichu pouze u nemocných bez přítomnosti mutace *parkinu*, na rozdíl od jedinců s mutací, kteří měli čich normální (Khan N.L. et al., 2004). Pozdější práce našla hyposmii mezi pacienty s heterozygotní mutací *parkinu*, zatímco přenašeči heterozygotní mutace bez projevů PN a složení heterozygoti se známkami PN, hyposmii neměli. Mechanismus, jakým mutace *parkinu* ovlivňují rozvoj hyposmie, však zůstává nejasný (Alcalay R.N. et al., 2011). Bez ohledu na přítomnost mutace, poruchu čichu udává 20 - 30% nemocných

s EOPD (Kim H.J. et al., 2011; Spica V. et al., 2013). My jsme ji zaznamenali ve čtvrtině případů.

Ve vysokém procentu si pacienti stěžovali na poruchy spánku, zejména na nadměrnou denní spavost (48,6%), která může být potencována užíváním dopaminergní agonistů (Happe S. & Berger K., 2001). Častým symptomem byla také hypersalivace (43%), ostatní obtíže spojené gastrointestinálním traktem (obstipace, potíže při polykání) měla zhruba čtvrtina pacientů. V podobném rozsahu trpěli nemocní i dalšími příznaky vegetativní dysfunkce, např. poruchami urogenitálního traktu (inkontinence, sexuální obtíže) a projevy ortostatické hypotenze. Bolest byla přítomna u 20% pacientů. Necelá pětina nemocných udávala vizuální halucinace, které bývají obvykle spojeny s dopaminergní medikací, zejména v pokročilejších stádiích PN (Zhou C.Q. et al., 2014).

5.1.4. Komplikace, fluktuace hybnosti a polékové dyskineze

Brzký rozvoj fluktuací hybnosti a polékových dyskinezi je dalším charakteristickým rysem EOPD (Schrag A. & Schott J.M., 2006). Wearing-off byl v našem souboru zaznamenán v 70% a peak-of-dose dyskineze v 50% případů, průměrná doba začátku těchto příznaků od nasazení dopaminergní medikace dosahovala 5 let. Polovina nemocných měla projevy freezingu a hesitací, u čtvrtiny byla přítomna posturální instabilita s pády. Zlepšení hybného stavu spánkem (sleep benefit) udávalo 50% pacientů. Tyto výsledky se zásadně neliší od předchozího popisu fenotypu EOPD (Grunewald A. et al., 2013; Kim H.J. et al., 2011; Lohmann E. et al., 2009).

5.1.5. Léčba

Výbornou odpovídavost na dopaminergní léčbu, zejména na začátku onemocnění, má většina nemocných s EOPD (Grunewald A. et al., 2013), což jsme pozorovali také u našich pacientů. Doba od prvních projevů PN do nasazení dopaminergní medikace (3,5 roku) byla téměř stejná jako prodleva od začátku nemoci do určení diagnózy (3,4 roku). To odráží rozhodující význam dopaminergní odpovídavosti mezi diagnostickými kritérii

PN (Jankovic J., 2008). Dobrý kognitivní stav spolu s časným rozvojem dyskinezií a fluktuací, činí z pacientů s časným začátkem PN vhodné kandidáty pro léčbu hlubokou mozkovou stimulací (DBS - deep brain stimulation) (Bronstein J.M. et al., 2011). V našem souboru byla zavedena u 30% nemocných.

5.2. Rizikové faktory

Kouření cigaret a pití kávy je považováno za protektivní faktor PN, naopak práce v zemědělství a expozice pesticidům může riziko vzniku onemocnění zvyšovat (Kiebertz K. & Wunderle K.B., 2013).

V naší studii kouřilo aktivně 15,7% pacientů, což je v porovnání s prevalencí kouření v ČR (29,1%) (Gallus S. et al., 2014) poměrně malé číslo. Pro uplatnění rizikových faktorů je však zásadní míra expozice před rozvojem nemoci. Při detailnějším zkoumání výskytu kouření u nemocných bylo patrné, že řada z nich zanechala kouření cigaret krátce před či po začátku onemocnění, jiní naopak začali kouřit až v průběhu PN. Proto jsme pro analýzu rizika kouření vybrali pacienty, kteří kouřili před vznikem onemocnění. Za kritérium minimální expozice jsme považovali kouření pěti cigaret denně v intervalu alespoň pěti let (kumulativní dávka ≥ 9125 cigaret). Při stanovení této hranice jsme vycházeli z údajů týkajících se biologických účinků chronického stresu. Osoby vystavené chronickému stresu po dobu pěti let mají významně vyšší riziko rozvoje kardiovaskulárních onemocnění (Rosengren A. et al., 1991). Recentní výzkum ukázal, že chronický stres má podobný klinický dopad jako kouření pěti cigaret denně (Richardson S. et al., 2012). Předpokládáme tedy, že námi zvolený práh kouření je dostatečnou kumulativní expozicí, která může ovlivnit rozvoj organického onemocnění (přínejmenším ischemické choroby srdeční). Takto definovaná kritéria splňovala třetina nemocných (34,3%) a čtvrtina kontrol. Průměrný počet vykouřených cigaret za den se u nemocných a kontrol signifikantně neodlišoval (tabulka 5). V prevalenci kouření v obou skupinách nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl, protektivní vliv kouření na riziko rozvoje PN jsme tedy neprokázali (tabulka 6).

V případě pití kávy jsme měli k dispozici méně anamnestických dat, než tomu bylo u kouření cigaret. Především chyběl údaj o celkové době příjmu kávy. Předpokládáme ale, že pití kávy je obvykle dlouhodobý zvyk. Počet vypitých šálek za den se mezi skupinou pacientů a kontrol významně nelišil (tabulka 5). V našem souboru

představovala káva faktor spojený se signifikantně nižším rizikem vzniku PN (tabulka 6). Naopak práce v zemědělství a expozice pesticidům či jiným chemikáliím byla asociována s vyšším rizikem rozvoje PN (tabulka 6).

Výše uvedené výsledky bude třeba ověřit na větším souboru populačních kontrol, neboť u zdravých dobrovolníků (dárců krve), zejména s ohledem na prevalenci rizikových faktorů, hrozí výběrové zkreslení (bias).

5.3. Genotyp

5.3.1. Polymorfismy

Polymorfismy p.S167N a p.D394N byly přítomny téměř ve stejném měřítku mezi pacienty i kontrolami. Přestože jsou tyto genetické změny v HGMD klasifikovány jako polymorfismy asociované s nemocí (disease-associated polymorphism), meta-analytické studie neprokázaly asociaci těchto polymorfismů s rizikem vzniku PN (Zhang Y. et al., 2012a; Zhang Y. et al., 2012b).

Polymorfismus p.V380L se vyskytoval bez mála dvakrát častěji u kontrol než u pacientů. Toto pozorování odpovídá výsledkům recentní meta-analýzy, která prokázala asociaci polymorfismu p.V380L s nižším rizikem rozvoje PN (Zhang Y. et al., 2013), navzdory tomu, že tento polymorfismus je v HGMD stále uveden mezi polymorfismy asociovanými s nemocí.

5.3.2. Vzácné alelické varianty

U jedné kontroly jsme našli novou alelickou variantu p.V380I (c.1138G>A). Analýza pomocí nástrojů MutPred s SIFT predikovala nízké riziko patogenního chování (tabulka 8).

Varianta p.A82E (označená v HGMD jako mutace způsobující nemoc, disease causing mutation) byla identifikována u jednoho pacienta. Tato genetická změna s velkou pravděpodobností není patogenní. Byla pozorována u zdravých kontrol (Kay D.M. et al., 2007), má benigní predikční analýzu (tabulka 8) a nemá efekt na subcelulární distribuci parkinu in vitro (Cookson M.R. et al., 2003).

Dle predikční analýzy působí alelická varianta p.R402C poškození proteinu (tabulka 8) a rovněž v HGMD je řazena mezi mutace. Její patogenní vliv je však sporný, neboť byla popsána také u zdravých jedinců (Schlitter A.M. et al., 2006). V našem souboru jsme heterozygotní alelickou variantu p.R402C našli u jednoho pacienta a jedné kontroly. Frekvence recesivní alely (minor allele frequency) je podle údajů EVS 0,26%. Proto

předpokládáme, že genetická změna p.R402C představuje nepatogenní tichou (silent) substituci.

5.3.3. Mutace

Mutace *parkinu* byly přítomny u pěti pacientů (7,1%). Jednalo se o bodovou mutaci p.R334C (tabulka 7, pacient 8) a čtyři exonové delece, které vždy zahrnovaly exon 2 (tabulka 7, pacient 3 a 24-26), jenž kóduje Ubl doménu (Corti O. et al., 2011). Tato doména inhibuje autoubikvitinaci parkinu a zabraňuje tím jeho degradaci v UPS, je proto klíčová pro normální funkci bílkoviny (Chaugule V.K. et al., 2011). Výskyt delecí nebyl zaznamenán u žádné z kontrol, což poukazuje na pravděpodobnou patogenní úlohu exonových delecí *parkinu* v etiologii EOPD.

Kromě jedné homozygotní delece exonu 4, byly všechny mutace pozorovány v heterozygotní konstituci. S ohledem na AR dědičnost EOPD, pouze homozygotní nebo dvě složené heterozygotní mutace jsou zodpovědné za vznik onemocnění. V případě jedné heterozygotní mutace, je funkce poškozené alely kompenzována alelou druhou a nemělo by dojít k rozvoji patologie. Nicméně až 50% pacientů se má pouze jednu heterozygotní mutaci (Klein C. et al., 2007). Ačkoli klinický význam mutací v heterozygotní konstituci je u AR nemocí sporný, zdá se, že heterozygotní mutace *parkinu* mají vliv na riziko rozvoje PN (Klein C. et al., 2007). Pro způsob, jakým je heterozygotní mutace schopna imitovat AD typ dědičnosti a vyvolat příznaky onemocnění, lze najít více vysvětlení. Množství proteinu produkovaného zdravou alelou nemusí stačit k zajištění fyziologických funkcí nebo mutantní protein negativně ovlivní expresi své normální varianty. Mutace může také indukovat novou patogenní funkci bílkoviny (Klein C. et al., 2007). Pro roli heterozygotních mutací *parkinu* v patogenezi PN svědčí též pozorování u zdravých přenašečů. Přenašeči heterozygotní mutace *parkinu* vykazují na PET presynaptickou dopaminergní dysfunkci ve striatu (Hilker R. et al., 2001; Khan N.L. et al., 2002a) a mají zvýšenou echogenitu SNc, která odpovídá obrazu degenerace této kmenové struktury (Hagenah J.M. et al., 2007; Walter U. et al., 2004).

Ačkoli některé práce uvádějí vysokou frekvenci mutací *parkinu* u pacientů s EOPD (až 50% familiární a 18% sporadické formy) (Lucking C.B. et al., 2000; Monroy-Jaramillo N. et al., 2014), prevalence mutací v našem souboru, podobně jako v celé řadě dalších studií (Brooks J. et al., 2009; Choi J.M. et al., 2008; Kilarski L.L. et al., 2012; Mellick G.D. et al., 2009), byla relativně nízká (7,1%). Tyto rozdíly mezi studiemi mohou být vysvětleny více faktory, zejména populačně specifickou variabilitou četnosti alelických variant, různým poměrem nemocných s familiární a sporadickou formou EOPD ve studii, rozdílnými kritérii pro maximální věk při vzniku EOPD či odlišnými pravidly, podle kterých byly alelické varianty klasifikovány jako mutace. Vzhledem k tomu, že jsme v naší práci neanalyzovali introny a oblast promotoru, je možné, že některé patogenní změny *parkinu* nebyly identifikovány. Na druhou stranu, mutace v oblasti intronů představují pouhých 8,2% ze všech známých mutací (Grunewald A. et al., 2013), takže pravděpodobnost jejich záchytu není příliš vysoká. U genetických změn promotoru navíc nebyla jednoznačně prokázána asociace s EOPD (Chang X.L. et al., 2011).

V naší studii bylo 10 pacientů (14,3%) s výskytem EOPD v rodině, ale jen u jednoho z nich (10,0%) jsme našli mutaci *parkinu*. Toto zjištění je poměrně překvapivé, neboť záchyt mutací u familiární formy EOPD bývá obvykle podstatně vyšší (Bruggemann N. & Klein C., 1993; Kim H.J. et al., 2011; Lucking C.B. et al., 2000; Marder K.S. et al., 2010). Naše pozorování se blíží výsledkům v souboru 79 polských pacientů (vznik PN \leq 40 let), kde byly mutace *parkinu* identifikovány pouze ve třech případech (3,8%) a z celkem 16 (20%) nemocných s familiárním výskytem EOPD měla mutaci jen jediná osoba (6%) (Koziorowski D. et al., 2010). Malé procento záchytu mutací by proto mohlo svědčit pro významnější roli negativních vlivů vnějšího prostředí. S ohledem na nízkou prevalenci mutací u familiární formy EOPD v naší i polské populaci je však pravděpodobné, že se na patogenезi onemocnění u Slovanů podílejí kromě *parkinu* další genetické faktory.

5.3.4. Rozdíly v prevalenci alelických změn *parkinu* u pacientů a kontrol

Statisticky významný rozdíl v četnosti alelických variant *parkinu* mezi pacienty a kontrolami nebyl prokázán (tabulka 8). Nicméně ve dvou případech byly pozorovány výrazné rozdíly četnosti: téměř dvojnásobná frekvence heterozygotního polymorfismu p.V380L u kontrol ($p = 0,062$; OR = 0,44; 95% CI = 0,18 - 1,04) and přítomnost heterozygotních delecí exonu 2 pouze u pacientů ($p = 0,052$; OR = 10,22; 95% CI = 0,54 - 193,50).

5.4. Soubor pacientů a statistická analýza

EOPD je vzácná forma PN definovaná rozvojem příznaků do 40 let věku (Bruggemann N. & Klein C., 1993), nicméně v celé řadě studií je použita vyšší věková hranice, nejčastěji 45 (Guerrero Camacho J.L. et al., 2012; Monroy-Jaramillo N. et al., 2014; Padmaja M.V. et al., 2012) nebo dokonce 50 let (Bozi M. et al., 2013; de Mena L. et al., 2013; Gaweda-Walerych K. et al., 2012; Moura K.C. et al., 2013). Incidence PN roste s věkem a v intervalu 40 - 49 let je pětikrát vyšší než v rozmezí 30 - 39 let (Van Den Eeden S.K. et al., 2003). Posunutím věkové hranice na 45 či 50 let lze násobně rozšířit soubor pacientů. Tento přístup však vede k výrazné fenotypové heterogenitě studované skupiny nemocných, která může být zdrojem dezinterpretace při porovnávání výsledků mezi různými studii. Abychom získali soubor s co nejvíce homogenním fenotypem, rozhodli jsme se dodržet kritérium začátku EOPD do 40 let, ovšem za cenu výrazně menšího souboru nemocných. Relativně malá velikost souboru pacientů (n=70) spolu s nízkým výskytem mutací (n=5; 7,1%) představovaly hlavní limitaci statistické analýzy našich výsledků.

6. Závěr

Tato práce je první systematickou studií fenotypu EOPD a genetických změn *parkinu* v české populaci. Přináší detailní fenotypovou charakteristiku pacientů s EOPD, hodnotí vliv faktorů vnějšího prostředí na riziko vzniku onemocnění a analyzuje alelické varianty *parkinu* u nemocných a zdravých kontrol.

Mezi hlavní fenotypové rysy pacientů s EOPD patřily neporušené kognitivní funkce, častý výskyt dystonie, deprese a hyperhidrózy. Typická byla výborná odpovídavost na dopaminergní léčbu na začátku onemocnění, zlepšení příznaků po vyspání (sleep benefit) a časný rozvoj polékových dyskinezií a hybných fluktuací. Pacienti s mutacemi *parkinu* měly signifikantně nižší věk při vzniku onemocnění.

Práce v zemědělství a expozice pesticidům či jiným chemikáliím byly spojeny s vyšším rizikem rozvoje onemocnění, naopak pití kávy mělo protektivní vliv. U kouření cigaret nebyl prokázán vztah k riziku nemoci.

V četnosti polymorfismů *parkinu* jsme u pacientů a kontrol našli výraznější rozdíl, pouze polymorfismus p.V380L měl téměř dvakrát vyšší frekvenci v kontrolní skupině, kde jsme také zachytili novou alelickou variantu p.V380I. Mutace *parkinu* byly identifikovány u pěti nemocných (7,1%), v kontrolní skupině jsme jejich výskyt nezaznamenali. Většinu mutací tvořily heterozygotní exonové delece různého rozsahu, které vždy zahrnovaly delecí exonu 2. Statistickou analýzou se nepodařilo prokázat signifikantní rozdíl četnosti genetických změn mezi pacienty a kontrolami, na čemž může mít podíl relativně malý soubor nemocných (n=70) a nízká frekvence genetických alterací. Vzhledem k malé prevalenci mutací *parkinu* v naší i polské populaci (Koziorowski D. et al., 2010) je pravděpodobné, že se v patogenezi EOPD u Slovanů uplatňují další genetické změny, které jsou nyní předmětem našeho dalšího výzkumu pomocí exomového sekvenování.

7. Poděkování

Na prvním místě bych chtěl poděkovat svému školiteli, prof. MUDr. Evženu Růžičkovi, DrSc., FCMA, za vedení a inspiraci k výzkumné práci, za přátelský a trpělivý přístup, za možnost s ním spolupracovat a učit se od něj již od svých pregraduálních let. Dále děkuji konzultantovi, prof. MUDr. Pavlu Martáskovi, DrSc., za vstřícnost a cenné rady k metodice této práce. Dík patří rovněž všem spolupracovníkům, kteří se podíleli na genetických analýzách, zejména RNDr. Daniele Záhorákové, Ph.D., která významnou měrou přispěla ke kompletaci výsledků sekvenování, a RNDr. Miladě Matějčkové, jež se podílela na identifikaci exonových delecí. V neposlední řadě bych chtěl vyjádřit svůj dík paní Aleně Puchmajerové a paní Ireně Stárkové, za obětavou práci při zpracování genetického materiálu a organizaci klinických vyšetření.

Práce byla podpořena těmito granty: IGA NR9215, RVO-VFN64165/2012, PRVOUK P26/LF1/4, UNCE 204011/2012

8. Seznam použitých zkratk

AD	<i>autozomálně dominantní</i>	LOPD	<i>Parkinsonova nemoc s pozdním začátkem</i>
AR	<i>autozomálně recesivní</i>	LRRK2	<i>leucine rich repeat kinase 2</i>
ATP13A2	<i>ATPáza typ 13A2</i>	M	<i>mutace vyvolávající nemoc</i>
ATPáza	<i>enzym, který hydrolyzuje ATP (adenosintrifosfát)</i>	MAO-B	<i>monoaminoxidáza B</i>
BH4	<i>tetrahydrobiopterin</i>	MAPT	<i>microtubule-associated protein tau</i>
CDCrel-1	<i>cell division cycle-related protein 1</i>	MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
CDK5	<i>cyklin-dependentní kináza 5</i>	MMSE	<i>Mini-mental state examination</i>
CI	<i>konfidenční interval</i>	mtDNA	<i>mitochondriální DNA</i>
CNS	<i>centrální nervová soustava</i>	NA	<i>není dostupné (not available)</i>
DBS	<i>hluboká mozková stimulace</i>	NBIA	<i>neurodegenerace s akumulací železa</i>
DJ-1	<i>Daisuke-Junko-1</i>	ND3	<i>NADH dehydrogenáza 3</i>
DMSO	<i>dimethylsulfoxid</i>	NK-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
DNAJC6	<i>DnaJ/Hsp40 homolog, subfamily C, member 6</i>	NMSS	<i>Non-motor symptoms scale</i>
DRD	<i>dopa-responzivní dystonie</i>	Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor</i>
EDTA	<i>kyselina ethylendiaminotetraoctová</i>	OR	<i>odds ratio</i>
EIF4G1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4-gamma 1</i>	P	<i>polymorfismus asociovaný s nemocí</i>
EOPD	<i>Parkinsonova nemoc s časným začátkem</i>	Pael-R	<i>parkin-associated endothelin receptor-like receptor</i>
EVS	<i>Exome variant server</i>	PCR	<i>polymerázová řetězová reakce</i>
FBXO7	<i>F-box only protein 7</i>	PET	<i>pozitronová emisní tomografie</i>
fMRI	<i>funkční magnetická rezonance</i>	PINK1	<i>PTEN(phosphatase and tensin homolog)-induced kinase 1</i>
GBA	<i>glukocerebrosidáza</i>	PLA2G6	<i>phospholipase A2, group VI</i>
GIGYF2	<i>grb10-interacting GYF protein-2</i>	PN	<i>Parkinsonova nemoc</i>
Grb10	<i>growth factor receptor-bound protein</i>	POLG1	<i>mitochondriální DNA polymeráza gama</i>
GTPáza	<i>enzym, který hydrolyzuje GTP (guanosintrifosfát)</i>	PP	<i>pyramidové příznaky</i>
Het	<i>heterozygotní</i>	RING	<i>really interesting new gene doména proteinu parkin</i>
HGMD	<i>Human gene mutation database</i>	ROS	<i>reactive oxygen species; volné radikály</i>
Hom	<i>homozygotní</i>	SIFT	<i>Sorting intolerant from tolerant</i>
HRM	<i>high resolution melt</i>	SNC	<i>substantia nigra pars compacta</i>
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>	SNCA	<i>alfa-synuklein</i>
HTRA2/OMI	<i>high temperature requirement protein A2</i>	SPR	<i>sepiapterin reduktáza</i>
H-Y	<i>stupnice podle Hoehnové a Yakra</i>	SYNJ1	<i>synaptojanin 1</i>
IBR	<i>in between RINGdoména proteinu parkin</i>	Ubl	<i>ubiquitin-like doména proteinu parkin</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>	UCH-L1	<i>ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1</i>
KRS	<i>Kuforův-Rakebův syndrom</i>	UPS	<i>ubikvitin-proteasomový systém</i>
L-DOPA	<i>L-3,4-dihydroxyfenylalanin; levodopa</i>	VPS35	<i>vacuolar protein sorting 35</i>

9. Literatura

- [1] Ahle S, Ungewickell E. Auxilin, a newly identified clathrin-associated protein in coated vesicles from bovine brain. *J Cell Biol* 1990; 111 (1): 19-29.
- [2] Ahlskog JE. Parkin and PINK1 parkinsonism may represent nigral mitochondrial cytopathies distinct from Lewy body Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15 (10): 721-727.
- [3] Alcalay RN, Siderowf A, Ottman R, Caccappolo E, Mejia-Santana H, Tang MX et al. Olfaction in Parkin heterozygotes and compound heterozygotes: the CORE-PD study. *Neurology* 2011; 76 (4): 319-326.
- [4] 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.
- [5] Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B et al. Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013; 28 (6): 811-813.
- [6] Autere J, Moilanen JS, Finnila S, Soininen H, Mannermaa A, Hartikainen P et al. Mitochondrial DNA polymorphisms as risk factors for Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Hum Genet* 2004; 115 (1): 29-35.
- [7] Avraham E, Rott R, Liani E, Szargel R, Engelender S. Phosphorylation of Parkin by the Cyclin-dependent Kinase 5 at the Linker Region Modulates Its Ubiquitin-Ligase Activity and Aggregation. *J Biol Chem* 2007; 282 (17): 12842-12850.
- [8] Balsinde J, Balboa MA. Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal* 2005; 17 (9): 1052-1062.
- [9] Bembi B, Zambito Marsala S, Sidransky E, Ciana G, Carrozzi M, Zorzon M et al. Gaucher's disease with Parkinson's disease: clinical and pathological aspects. *Neurology* 2003; 61 (1): 99-101.

- [10] Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH et al. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 2006; 38 (5): 515-517.
- [11] Bennett MC. The role of alpha-synuclein in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther* 2005; 105 (3): 311-331.
- [12] Bodner RA, Outeiro TF, Altmann S, Maxwell MM, Cho SH, Hyman BT et al. Pharmacological promotion of inclusion formation: A therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases. *PNAS* 2006; 103 (11): 4246-4251.
- [13] Bonifati V. Genetics of Parkinson's disease--state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20 Suppl 1 S23-28.
- [14] Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E et al. Mutations in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Science* 2003; 299 (5604): 256-259.
- [15] Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology* 1999; 52 (6): 1214-1220.
- [16] Bozi M, Papadimitriou D, Antonellou R, Moraitou M, Maniati M, Vassilatis DK et al. Genetic assessment of familial and early-onset Parkinson's disease in a Greek population. *Eur J Neurol* 2013;
- [17] Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24 (2): 197-211.
- [18] Braak H, Rub U, Jansen Steur EN, Del Tredici K, de Vos RA. Cognitive status correlates with neuropathologic stage in Parkinson disease. *Neurology* 2005; 64 (8): 1404-1410.
- [19] Bronstein JM, Tagliati M, Alterman RL, Lozano AM, Volkmann J, Stefani A et al. Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Arch Neurol* 2011; 68 (2): 165.
- [20] 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.
- [21] Bruggemann N, Klein C. Parkin Type of Early-Onset Parkinson Disease. 1993;
- [22] Buhmann C, Binkofski F, Klein C, Buchel C, van Eimeren T, Erdmann C et al. Motor reorganization in asymptomatic carriers of a single mutant Parkin allele: a human model for presymptomatic parkinsonism. *Brain* 2005; 128 (10): 2281-2290.
- [23] Burchell VS, Nelson DE, Sanchez-Martinez A, Delgado-Camprubi M, Ivatt RM, Pogson JH et al. The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat Neurosci* 2013; 16 (9): 1257-1265.
- [24] Carmine Belin A, Westerlund M, Bergman O, Nissbrandt H, Lind C, Sydow O et al. S18Y in ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) associated with decreased risk of Parkinson's disease in Sweden. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13 (5): 295-298.
- [25] Clark LN, Wang Y, Karlins E, Saito L, Mejia-Santana H, Harris J et al. Frequency of LRRK2 mutations in early- and late-onset Parkinson disease. *Neurology* 2006; 67 (10): 1786-1791.
- [26] Clayton DF, George JM. Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J Neurosci Res* 1999; 58 (1): 120-129.
- [27] Clements CM, McNally RS, Conti BJ, Mak TW, Ting JPY. DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2. *PNAS* 2006; 103 (41): 15091-15096.
- [28] Cookson MR. The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11 (12): 791-797.
- [29] 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.
- [30] 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.

- [31] Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Luthi A, Kim WT, Takei K et al. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 1999; 99 (2): 179-188.
- [32] de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5 (6): 525-535.
- [33] de Mena L, Samaranch LL, Coto E, Cardo LF, Ribacoba R, Lorenzo-Betancor O et al. Mutational screening of PARKIN identified a 3' UTR variant (rs62637702) associated with Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 2013; 50 (2): 264-269.
- [34] Dehay B, Martinez-Vicente M, Caldwell GA, Caldwell KA, Yue Z, Cookson MR et al. Lysosomal impairment in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013; 28 (6): 725-732.
- [35] Dekker MC, Eshuis SA, Maguire RP, Veenma-van der Du L, Pruijm J, Snijders PJ et al. PET neuroimaging and mutations in the DJ-1 gene. *J Neural Transm* 2004; 111 (12): 1575-1581.
- [36] Deleidi M, Gasser T. The role of inflammation in sporadic and familial Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70 (22): 4259-4273.
- [37] Deng H, Gao K, Jankovic J. The VPS35 gene and Parkinson's disease. *Mov Disord* 2013a; 28 (5): 569-575.
- [38] Deng H, Liang H, Jankovic J. F-box only protein 7 gene in parkinsonian-pyramidal disease. *JAMA Neurol* 2013b; 70 (1): 20-24.
- [39] Deng J, Lewis PA, Greggio E, Sluch E, Beilina A, Cookson MR. Structure of the ROC domain from the Parkinson's disease-associated leucine-rich repeat kinase 2 reveals a dimeric GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105 (5): 1499-1504.
- [40] Devine MJ, Plun-Favreau H, Wood NW. Parkinson's disease and cancer: two wars, one front. *Nat Rev Cancer* 2011; 11 (11): 812-823.
- [41] Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Correia Guedes L et al. FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology* 2009; 72 (3): 240-245.

- [42] Di Fonzo A, Chien HF, Socal M, Giraudo S, Tassorelli C, Illiceto G et al. ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology* 2007; 68 (19): 1557-1562.
- [43] Do CB, Tung JY, Dorfman E, Kiefer AK, Drabant EM, Francke U et al. Web-based genome-wide association study identifies two novel loci and a substantial genetic component for Parkinson's disease. *PLoS Genet* 2011; 7 (6): e1002141.
- [44] Doherty KM, Silveira-Moriyama L, Parkkinen L, Healy DG, Farrell M, Mencacci NE et al. Parkin disease: a clinicopathologic entity? *JAMA Neurol* 2013; 70 (5): 571-579.
- [45] Douglas PM, Dillin A. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J Cell Biol* 2010; 190 (5): 719-729.
- [46] Edvardson S, Cinnamon Y, Ta-Shma A, Shaag A, Yim YI, Zenvirt S et al. A deleterious mutation in DNAJC6 encoding the neuronal-specific clathrin-uncoating co-chaperone auxilin, is associated with juvenile parkinsonism. *PLoS ONE* 2012; 7 (5): e36458.
- [47] Esposito G, Ana Clara F, Verstreken P. Synaptic vesicle trafficking and Parkinson's disease. *Dev Neurobiol* 2012; 72 (1): 134-144.
- [48] Exner N, Lutz AK, Haass C, Winklhofer KF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *EMBO J* 2012; 31 (14): 3038-3062.
- [49] Farrer MJ, Stone JT, Lin CH, Dachsel JC, Hulihan MM, Haugarvoll K et al. Lrrk2 G2385R is an ancestral risk factor for Parkinson's disease in Asia. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13 (2): 89-92.
- [50] Fiala O, Ruzicka E. Mezinárodní databáze Touretteova syndromu: zapojení do projektu v České republice. *Cesk Slov Neurol N* 2003; 33/99 (3): 197-202.
- [51] Follett J, Norwood SJ, Hamilton NA, Mohan M, Kovtun O, Tay S et al. The Vps35 D620N mutation linked to Parkinson's disease disrupts the cargo sorting function of retromer. *Traffic* 2014; 15 (2): 230-244.

- [52] 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.
- [53] Gallus S, Lugo A, La Vecchia C, Boffetta P, Chaloupka FJ, Colombo P et al. Pricing Policies And Control of Tobacco in Europe (PPACTE) project: cross-national comparison of smoking prevalence in 18 European countries. *Eur J Cancer Prev* 2014; 23 (3): 177-185.
- [54] Gasser T, Muller-Myhsok B, Wszolek ZK, Oehlmann R, Calne DB, Bonifati V et al. A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13. *Nat Genet* 1998; 18 (3): 262-265.
- [55] Gaweda-Walerych K, Safranow K, Jasinska-Myga B, Bialecka M, Klodowska-Duda G, Rudzinska M et al. PARK2 variability in Polish Parkinson's disease patients--interaction with mitochondrial haplogroups. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18 (5): 520-524.
- [56] Gegg ME, Burke D, Heales SJ, Cooper JM, Hardy J, Wood NW et al. Glucocerebrosidase deficiency in substantia nigra of parkinson disease brains. *Ann Neurol* 2012; 72 (3): 455-463.
- [57] Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* 2010; 19 (24): 4861-4870.
- [58] Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 2010; 12 (2): 119-131.
- [59] Gelmetti V, Ferraris A, Brusa L, Romano F, Lombardi F, Barzaghi C et al. Late onset sporadic Parkinson's disease caused by PINK1 mutations: clinical and functional study. *Mov Disord* 2008; 23 (6): 881-885.
- [60] Giovannini P, Piccolo I, Genitrini S, Soliveri P, Girotti F, Geminiani G et al. Early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 1991; 6 (1): 36-42.

- [61] Glauser L, Sonnay S, Stafa K, Moore DJ. Parkin promotes the ubiquitination and degradation of the mitochondrial fusion factor mitofusin 1. *J Neurochem* 2011; 118 (4): 636-645.
- [62] Goldberg MS, Lansbury PT, Jr. Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nat Cell Biol* 2000; 2 (7): E115-119.
- [63] Gorner K, Holtorf E, Waak J, Pham T-T, Vogt-Weisenhorn DM, Wurst W et al. Structural Determinants of the C-terminal Helix-Kink-Helix Motif Essential for Protein Stability and Survival Promoting Activity of DJ-1. *J Biol Chem* 2007; 282 (18): 13680-13691.
- [64] Gowers W (1900) *A Manual of Diseases of the Nervous System*, Vol. 1, Philadelphia: Blakiston's Son.
- [65] Greenbaum EA, Graves CL, Mishizen-Eberz AJ, Lupoli MA, Lynch DR, Englander SW et al. The E46K mutation in alpha-synuclein increases amyloid fibril formation. *J Biol Chem* 2005; 280 (9): 7800-7807.
- [66] Grunewald A, Arns B, Seibler P, Rakovic A, Munchau A, Ramirez A et al. ATP13A2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with Kufor-Rakeb syndrome. *Neurobiol Aging* 2012; 33 (8): 1843 e1841-1847.
- [67] Grunewald A, Kasten M, Ziegler A, Klein C. Next-generation phenotyping using the parkin example: time to catch up with genetics. *JAMA Neurol* 2013; 70 (9): 1186-1191.
- [68] Guerrero Camacho JL, Monroy Jaramillo N, Yescas Gomez P, Rodriguez Violante M, Boll Woehrlen C, Alonso Vilatela ME et al. High frequency of Parkin exon rearrangements in Mexican-mestizo patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27 (8): 1047-1051.
- [69] Gui YX, Xu ZP, Wen L, Liu HM, Zhao JJ, Hu XY. Four novel rare mutations of PLA2G6 in Chinese population with Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2013; 19 (1): 21-26.

- [70] Habig K, Walter M, Poths S, Riess O, Bonin M. RNA interference of LRRK2-microarray expression analysis of a Parkinson's disease key player. *Neurogenetics* 2008; 9 (2): 83-94.
- [71] Haehner A, Boesveldt S, Berendse HW, Mackay-Sim A, Fleischmann J, Silburn PA et al. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease--a multicenter study. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15 (7): 490-494.
- [72] Hagenah JM, Konig IR, Becker B, Hilker R, Kasten M, Hedrich K et al. Substantia nigra hyperechogenicity correlates with clinical status and number of Parkin mutated alleles. *J Neurol* 2007; 254 (10): 1407-1413.
- [73] Halliday GM, Stevens CH. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2011; 26 (1): 6-17.
- [74] Hampe C, Ardila-Osorio H, Fournier M, Brice A, Corti O. Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum Mol Genet* 2006; 15 (13): 2059-2075.
- [75] Hampshire DJ, Roberts E, Crow Y, Bond J, Mubaidin A, Wriekat AL et al. Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36. *J Med Genet* 2001; 38 (10): 680-682.
- [76] Happe S, Berger K. The association of dopamine agonists with daytime sleepiness, sleep problems and quality of life in patients with Parkinson's disease--a prospective study. *J Neurol* 2001; 248 (12): 1062-1067.
- [77] Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S et al. Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 2008; 7 (7): 583-590.
- [78] Hedrich K, Djarmati A, Schafer N, Hering R, Wellenbrock C, Weiss PH et al. DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2004; 62 (3): 389-394.
- [79] Hedrich K, Winkler S, Hagenah J, Kabakci K, Kasten M, Schwinger E et al. Recurrent LRRK2 (Park8) mutations in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; 21 (9): 1506-1510.

- [80] Henn IH, Bouman L, Schlehe JS, Schlierf A, Schramm JE, Wegener E et al. Parkin Mediates Neuroprotection through Activation of I κ B Kinase/Nuclear Factor- κ B Signaling. *J Neurosci* 2007; 27 (8): 1868-1878.
- [81] Herrup K, Yang Y. Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci* 2007; 8 (5): 368-378.
- [82] Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson H, Johannsdottir HS, Sainz J et al. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2002; 52 (5): 549-555.
- [83] Hilker R, Klein C, Ghaemi M, Kis B, Strotmann T, Ozelius LJ et al. Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial parkinsonism associated with mutations in the parkin gene. *Ann Neurol* 2001; 49 (3): 367-376.
- [84] Hirst J, Sahlender DA, Li S, Lubben NB, Borner GH, Robinson MS. Auxilin depletion causes self-assembly of clathrin into membraneless cages in vivo. *Traffic* 2008; 9 (8): 1354-1371.
- [85] Horvath R, Kley RA, Lochmuller H, Vorgerd M. Parkinson syndrome, neuropathy, and myopathy caused by the mutation A8344G (MERRF) in tRNALys. *Neurology* 2007; 68 (1): 56-58.
- [86] 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): 181-184.
- [87] Chang XL, Mao XY, Li HH, Zhang JH, Li NN, Burgunder JM et al. Functional parkin promoter polymorphism in Parkinson's disease: new data and meta-analysis. *J Neurol Sci* 2011; 302 (1-2): 68-71.
- [88] Chang YF, Cheng CM, Chang LK, Jong YJ, Yuo CY. The F-box protein Fbxo7 interacts with human inhibitor of apoptosis protein cIAP1 and promotes cIAP1 ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342 (4): 1022-1026.

- [89] Chartier-Harlin MC, Dachsel JC, Vilarino-Guell C, Lincoln SJ, LePrete F, Hulihan MM et al. Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89 (3): 398-406.
- [90] Chaugule VK, Burchell L, Barber KR, Sidhu A, Leslie SJ, Shaw GS et al. Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO J* 2011; 30 (14): 2853-2867.
- [91] Cherra SJ, 3rd, Steer E, Gusdon AM, Kiselyov K, Chu CT. Mutant LRRK2 elicits calcium imbalance and depletion of dendritic mitochondria in neurons. *Am J Pathol* 2013; 182 (2): 474-484.
- [92] Choi JM, Woo MS, Ma HI, Kang SY, Sung YH, Yong SW et al. Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease. *Neurogenetics* 2008; 9 (4): 263-269.
- [93] Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J et al. Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med* 2001; 7 (10): 1144-1150.
- [94] Iaccarino C, Crosio C, Vitale C, Sanna G, Carri MT, Barone P. Apoptotic mechanisms in mutant LRRK2-mediated cell death. *Hum Mol Genet* 2007; 16 (11): 1319-1326.
- [95] Ibanez P, Bonnet AM, Debarges B, Lohmann E, Tison F, Pollak P et al. Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004; 364 (9440): 1169-1171.
- [96] Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 2001; 105 (7): 891-902.
- [97] Ishihara-Paul L, Hulihan MM, Kachergus J, Upmanyu R, Warren L, Amouri R et al. PINK1 mutations and parkinsonism. *Neurology* 2008; 71 (12): 896-902.
- [98] Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79 (4): 368-376.

- [99] Junn E, Ronchetti RD, Quezado MM, Kim SY, Mouradian MM. Tissue transglutaminase-induced aggregation of alpha-synuclein: Implications for Lewy body formation in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 (4): 2047-2052.
- [100] Junn E, Taniguchi H, Jeong BS, Zhao X, Ichijo H, Mouradian MM. Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death. *PNAS* 2005; 102 (27): 9691-9696.
- [101] Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J et al. Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet* 2005; 76 (4): 672-680.
- [102] Kalia LV, Kalia SK, McLean PJ, Lozano AM, Lang AE. alpha-Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann Neurol* 2013; 73 (2): 155-169.
- [103] Kann M, Jacobs H, Mohrmann K, Schumacher K, Hedrich K, Garrels J et al. Role of parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2002; 51 (5): 621-625.
- [104] Kasten M, Klein C. The many faces of alpha-synuclein mutations. *Mov Disord* 2013; 28 (6): 697-701.
- [105] Kawahara K, Hashimoto M, Bar-On P, Ho GJ, Crews L, Mizuno H et al. {alpha}-Synuclein Aggregates Interfere with Parkin Solubility and Distribution: ROLE IN THE PATHOGENESIS OF PARKINSON DISEASE. *J Biol Chem* 2008; 283 (11): 6979-6987.
- [106] Kay DM, Moran D, Moses L, Poorkaj P, Zabetian CP, Nutt J et al. Heterozygous parkin point mutations are as common in control subjects as in Parkinson's patients. *Ann Neurol* 2007; 61 (1): 47-54.
- [107] Keller MF, Saad M, Bras J, Bettella F, Nicolaou N, Simon-Sanchez J et al. Using genome-wide complex trait analysis to quantify 'missing heritability' in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2012; 21 (22): 4996-5009.

- [108] Kett LR, Boassa D, Ho CC, Rideout HJ, Hu J, Terada M et al. LRRK2 Parkinson disease mutations enhance its microtubule association. *Hum Mol Genet* 2012; 21 (4): 890-899.
- [109] Khan NL, Brooks DJ, Pavese N, Sweeney MG, Wood NW, Lees AJ et al. Progression of nigrostriatal dysfunction in a parkin kindred: an [18F]dopa PET and clinical study. *Brain* 2002a; 125 (10): 2248-2256.
- [110] Khan NL, Graham E, Critchley P, Schrag AE, Wood NW, Lees AJ et al. Parkin disease: a phenotypic study of a large case series. *Brain* 2003; 126 (Pt 6): 1279-1292.
- [111] Khan NL, Katzenschlager R, Watt H, Bhatia KP, Wood NW, Quinn N et al. Olfaction differentiates parkin disease from early-onset parkinsonism and Parkinson disease. *Neurology* 2004; 62 (7): 1224-1226.
- [112] Khan NL, Valente EM, Bentivoglio AR, Wood NW, Albanese A, Brooks DJ et al. Clinical and subclinical dopaminergic dysfunction in PARK6-linked parkinsonism: an 18F-dopa PET study. *Ann Neurol* 2002b; 52 (6): 849-853.
- [113] Khateeb S, Flusser H, Ofir R, Shelef I, Narkis G, Vardi G et al. PLA2G6 mutation underlies infantile neuroaxonal dystrophy. *Am J Hum Genet* 2006; 79 (5): 942-948.
- [114] Kiebertz K, Wunderle KB. Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Mov Disord* 2013; 28 (1): 8-13.
- [115] Kiely AP, Asi YT, Kara E, Limousin P, Ling H, Lewis P et al. alpha-Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? *Acta Neuropathol* 2013; 125 (5): 753-769.
- [116] Kilarski LL, Pearson JP, Newsway V, Majounie E, Knipe MD, Misbahuddin A et al. Systematic review and UK-based study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27 (12): 1522-1529.

- [117] Kim HJ, Lee JY, Yun JY, Kim SY, Park SS, Jeon BS. Phenotype analysis in patients with early onset Parkinson's disease with and without parkin mutations. *J Neurol* 2011; 258 (12): 2260-2267.
- [118] Kinumi T, Kimata J, Taira T, Ariga H, Niki E. Cysteine-106 of DJ-1 is the most sensitive cysteine residue to hydrogen peroxide-mediated oxidation in vivo in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317 (3): 722-728.
- [119] Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392 (6676): 605-608.
- [120] Kitao Y, Imai Y, Ozawa K, Kataoka A, Ikeda T, Soda M et al. Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation. *Hum Mol Genet* 2007; 16 (1): 50-60.
- [121] Klein C. Implications of genetics on the diagnosis and care of patients with Parkinson disease. *Arch Neurol* 2006; 63 (3): 328-334.
- [122] 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 (7): 652-662.
- [123] Klein C, Westenberger A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2 (1): a008888.
- [124] Ko HS, von Coelln R, Sriram SR, Kim SW, Chung KKK, Pletnikova O et al. Accumulation of the Authentic Parkin Substrate Aminoacyl-tRNA Synthetase Cofactor, p38/JTV-1, Leads to Catecholaminergic Cell Death. *J Neurosci* 2005; 25 (35): 7968-7978.
- [125] Koroglu C, Baysal L, Cetinkaya M, Karasoy H, Tolun A. DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability. *Parkinsonism Relat Disord* 2013; 19 (3): 320-324.

- [126] Kostic VS, Filipovic SR, Lecic D, Momcilovic D, Sokic D, Sternic N. Effect of age at onset on frequency of depression in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57 (10): 1265-1267.
- [127] Koziorowski D, Hoffman-Zacharska D, Slawek J, Szirkowicz W, Janik P, Bal J et al. Low frequency of the PARK2 gene mutations in Polish patients with the early-onset form of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2010; 16 (2): 136-138.
- [128] Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* 2006; 38 (5): 518-520.
- [129] Krebs CE, Karkheiran S, Powell JC, Cao M, Makarov V, Darvish H et al. The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum Mutat* 2013; 34 (9): 1200-1207.
- [130] Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998; 18 (2): 106-108.
- [131] Kruger R, Sharma M, Riess O, Gasser T, Van Broeckhoven C, Theuns J et al. A large-scale genetic association study to evaluate the contribution of Omi/HtrA2 (PARK13) to Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2011; 32 (3): 548 e549-518.
- [132] Kubo SI, Kitami T, Noda S, Shimura H, Uchiyama Y, Asakawa S et al. Parkin is associated with cellular vesicles. *J Neurochem* 2001; 78 (1): 42-54.
- [133] Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, Shono M, Akaike M, Azuma H et al. Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Hum Mol Genet* 2006; 15 (6): 883-895.
- [134] Kyratzi E, Pavlaki M, Stefanis L. The S18Y polymorphic variant of UCH-L1 confers an antioxidant function to neuronal cells. *Hum Mol Genet* 2008; ddn115.
- [135] Laitinen J, Samarut J, Holtta E. A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *Biotechniques* 1994; 17 (2): 316, 318, 320-312.

- [136] Laman H. Fbxo7 gets proactive with cyclin D/cdk6. *Cell Cycle* 2006; 5 (3): 279-282.
- [137] Lautier C, Goldwurm S, Durr A, Giovannone B, Tsiaras WG, Pezzoli G et al. Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2008; 82 (4): 822-833.
- [138] Lee SJ. Origins and effects of extracellular alpha-synuclein: implications in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 2008; 34 (1): 17-22.
- [139] Lee WW, Jeon BS. Clinical spectrum of dopa-responsive dystonia and related disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2014; 14 (7): 461.
- [140] Leroux P (1890) Contribution à l'étude des causes de la paralysie agitante. in Thesis, Paris.
- [141] Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998; 395 (6701): 451-452.
- [142] Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 2009; 18 (R1): R48-59.
- [143] Lesage S, Condroyer C, Lohman E, Troiano A, Tison F, Viallet F et al. Follow-up study of the GIGYF2 gene in French families with Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2010; 31 (6): 1069-1071; discussion 1072-1064.
- [144] Lesage S, Durr A, Tazir M, Lohmann E, Leutenegger A-L, Janin S et al. LRRK2 G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in North African Arabs. *N Engl J Med* 2006; 354 (4): 422-423.
- [145] Lev N, Ickowicz D, Melamed E, Offen D. Oxidative insults induce DJ-1 upregulation and redistribution: Implications for neuroprotection. *Neurotoxicology* 2008; 29 (3): 397-405.
- [146] Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ et al. Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 2008; 14 (5): 501-503.
- [147] Li L, Funayama M, Tomiyama H, Li Y, Yoshino H, Sasaki R et al. No evidence for pathogenic role of GIGYF2 mutation in Parkinson disease in Japanese patients. *Neurosci Lett* 2010;

- [148] 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.
- [149] Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002; 111 (2): 209-218.
- [150] Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, Wood NW, De Michele G, Bonnet AM et al. How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol* 2003; 54 (2): 176-185.
- [151] Lohmann E, Thobois S, Lesage S, Broussolle E, du Montcel ST, Ribeiro MJ et al. A multidisciplinary study of patients with early-onset PD with and without parkin mutations. *Neurology* 2009; 72 (2): 110-116.
- [152] Lopez de Maturana R, Aguila JC, Sousa A, Vazquez N, Del Rio P, Aiastui A et al. Leucine-rich repeat kinase 2 modulates cyclooxygenase 2 and the inflammatory response in idiopathic and genetic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2014; 35 (5): 1116-1124.
- [153] Lovering R, Hanson IM, Borden KL, Martin S, O'Reilly NJ, Evan GI et al. Identification and Preliminary Characterization of a Protein Motif Related to the Zinc Finger. *PNAS* 1993; 90 (6): 2112-2116.
- [154] Lowe J, McDermott H, Landon M, Mayer RJ, Wilkinson KD. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristic of human neurodegenerative diseases. *J Pathol* 1990; 161 (2): 153-160.
- [155] Lubbe S, Morris HR. Recent advances in Parkinson's disease genetics. *J Neurol* 2014; 261 (2): 259-266.
- [156] Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T et al. Association between Early-Onset Parkinson's Disease and Mutations in the Parkin Gene. *N Engl J Med* 2000; 342 (21): 1560-1567.

- [157] Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ et al. Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 2012; 338 (6109): 949-953.
- [158] Luoma PT, Eerola J, Ahola S, Hakonen AH, Hellstrom O, Kivisto KT et al. Mitochondrial DNA polymerase gamma variants in idiopathic sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2007; 69 (11): 1152-1159.
- [159] MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 2014; 508 (7497): 469-476.
- [160] Machida Y, Chiba T, Takayanagi A, Tanaka Y, Asanuma M, Ogawa N et al. Common anti-apoptotic roles of parkin and alpha-synuclein in human dopaminergic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332 (1): 233-240.
- [161] Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 2002; 277 (3): 1641-1644.
- [162] Manzoni C, Mamais A, Dihanich S, McGoldrick P, Devine MJ, Zerle J et al. Pathogenic Parkinson's disease mutations across the functional domains of LRRK2 alter the autophagic/lysosomal response to starvation. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 441 (4): 862-866.
- [163] Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Kruger R et al. Collaborative Analysis of {alpha}-Synuclein Gene Promoter Variability and Parkinson Disease. *JAMA* 2006; 296 (6): 661-670.
- [164] Marder KS, Tang MX, Mejia-Santana H, Rosado L, Louis ED, Comella CL et al. Predictors of parkin mutations in early-onset Parkinson disease: the consortium on risk for early-onset Parkinson disease study. *Arch Neurol* 2010; 67 (6): 731-738.
- [165] Martin LJ. Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012; 107 355-415.

- [166] Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR et al. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 2002; 277 (1): 439-444.
- [167] Matta S, Van Kolen K, da Cunha R, van den Bogaart G, Mandemakers W, Miskiewicz K et al. LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis. *Neuron* 2012; 75 (6): 1008-1021.
- [168] McGough IJ, Cullen PJ. Recent advances in retromer biology. *Traffic* 2011; 12 (8): 963-971.
- [169] McNeill A, Duran R, Hughes DA, Mehta A, Schapira AH. A clinical and family history study of Parkinson's disease in heterozygous glucocerebrosidase mutation carriers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83 (8): 853-854.
- [170] Mellick GD, Siebert GA, Funayama M, Buchanan DD, Li Y, Imamichi Y et al. Screening PARK genes for mutations in early-onset Parkinson's disease patients from Queensland, Australia. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15 (2): 105-109.
- [171] Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11 (1): 31-46.
- [172] Mills RD, Sim CH, Mok SS, Mulhern TD, Culvenor JG, Cheng HC. Biochemical aspects of the neuroprotective mechanism of PTEN-induced kinase-1 (PINK1). *J Neurochem* 2008; 105 (1): 18-33.
- [173] Miyake Y, Tanaka K, Fukushima W, Kiyohara C, Sasaki S, Tsuboi Y et al. UCHL1 S18Y variant is a risk factor for Parkinson's disease in Japan. *BMC Neurol* 2012; 12 62.
- [174] Monroy-Jaramillo N, Guerrero-Camacho JL, Rodriguez-Violante M, Boll-Woehrlen MC, Yescas-Gomez P, Alonso-Vilatela ME et al. Genetic mutations in early-onset Parkinson's disease Mexican patients: molecular testing implications. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2014; 165B (3): 235-244.
- [175] Morgan NV, Westaway SK, Morton JE, Gregory A, Gissen P, Sonek S et al. PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. *Nat Genet* 2006; 38 (7): 752-754.

- [176] Mougenot AL, Nicot S, Bencsik A, Morignat E, Verchere J, Lakhdar L et al. Prion-like acceleration of a synucleinopathy in a transgenic mouse model. *Neurobiol Aging* 2012; 33 (9): 2225-2228.
- [177] Moura KC, Campos Junior M, de Rosso AL, Nicaretta DH, Pereira JS, Silva DJ et al. Genetic analysis of PARK2 and PINK1 genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease. *Dis Markers* 2013; 35 (3): 181-185.
- [178] Mueller JC, Fuchs J, Hofer A, Zimprich A, Lichtner P, Illig T et al. Multiple regions of alpha-synuclein are associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2005; 57 (4): 535-541.
- [179] Munishkina LA, Phelan C, Uversky VN, Fink AL. Conformational behavior and aggregation of alpha-synuclein in organic solvents: modeling the effects of membranes. *Biochemistry* 2003; 42 (9): 2720-2730.
- [180] Murakami T, Moriwaki Y, Kawarabayashi T, Nagai M, Ohta Y, Deguchi K et al. PINK1, a gene product of PARK6, accumulates in {alpha}-synucleinopathy brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78 (6): 653-654.
- [181] Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, Tayebi N, Kim WS, Sidransky E et al. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain* 2014; 137 (Pt 3): 834-848.
- [182] Mutez E, Nkiliza A, Belarbi K, de Broucker A, Vanbesien-Mailliot C, Bleuse S et al. Involvement of the immune system, endocytosis and EIF2 signaling in both genetically determined and sporadic forms of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2014; 63 165-170.
- [183] Myhre R, Toft M, Kachergus J, Hulihan MM, Aasly JO, Klungland H et al. Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population. *Acta Neurol Scand* 2008; 118 (5): 320-327.
- [184] Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231 (2): 509-513.

- [185] Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 2008; 183 (5): 795-803.
- [186] Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH et al. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain* 2009; 132 (Pt 7): 1783-1794.
- [187] Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, Ohmann E, Deligtisch A, Tagliati M et al. LRRK2 G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2006; 354 (4): 424-425.
- [188] Padmaja MV, Jayaraman M, Srinivasan AV, Srisailapathy CR, Ramesh A. PARK2 gene mutations in early onset Parkinson's disease patients of South India. *Neurosci Lett* 2012; 523 (2): 145-147.
- [189] Paisan-Ruiz C, Bhatia KP, Li A, Hernandez D, Davis M, Wood NW et al. Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 2009; 65 (1): 19-23.
- [190] Paisan-Ruiz C, Guevara R, Federoff M, Hanagasi H, Sina F, Elahi E et al. Early-onset L-dopa-responsive parkinsonism with pyramidal signs due to ATP13A2, PLA2G6, FBXO7 and spatacsin mutations. *Mov Disord* 2010; 25 (12): 1791-1800.
- [191] Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 2004; 44 (4): 595-600.
- [192] Paisan-Ruiz C, Li A, Schneider SA, Holton JL, Johnson R, Kidd D et al. Widespread Lewy body and tau accumulation in childhood and adult onset dystonia-parkinsonism cases with PLA2G6 mutations. *Neurobiol Aging* 2012; 33 (4): 814-823.
- [193] Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Murrell J, Rudolph A et al. Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet* 2003; 12 (20): 2599-2608.

- [194] Pankratz N, Pauciulo MW, Elsaesser VE, Marek DK, Halter CA, Wojcieszek J et al. Mutations in DJ-1 are rare in familial Parkinson disease. *Neurosci Lett* 2006; 408 (3): 209-213.
- [195] Parisiadou L, Cai H. LRRK2 function on actin and microtubule dynamics in Parkinson disease. *Commun Integr Biol* 2010; 3 (5): 396-400.
- [196] Patil KS, Basak I, Lee S, Abdullah R, Larsen JP, Moller SG. PARK13 regulates PINK1 and subcellular relocation patterns under oxidative stress in neurons. *J Neurosci Res* 2014;
- [197] Perera RM, Zoncu R, Lucast L, De Camilli P, Toomre D. Two synaptojanin 1 isoforms are recruited to clathrin-coated pits at different stages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103 (51): 19332-19337.
- [198] Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, Ricard S et al. Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 2003; 126 (Pt 6): 1271-1278.
- [199] Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M et al. Wild-type PINK1 Prevents Basal and Induced Neuronal Apoptosis, a Protective Effect Abrogated by Parkinson Disease-related Mutations. *J Biol Chem* 2005; 280 (40): 34025-34032.
- [200] Pils A, Winklhofer KF. Parkin, PINK1 and mitochondrial integrity: emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2012; 123 (2): 173-188.
- [201] Plun-Favreau H, Klupsch K, Moiso N, Gandhi S, Kjaer S, Frith D et al. The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1. *Nat Cell Biol* 2007; 9 (11): 1243-1252.
- [202] Podhajska A, Musso A, Trancikova A, Stafa K, Moser R, Sonnay S et al. Common pathogenic effects of missense mutations in the P-type ATPase ATP13A2 (PARK9) associated with early-onset parkinsonism. *PLoS ONE* 2012; 7 (6): e39942.

- [203] Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G et al. Mapping of a Gene for Parkinson's Disease to Chromosome 4q21-q23. *Science* 1996; 274 (5290): 1197-1199.
- [204] Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A et al. Mutation in the {alpha}-Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* 1997; 276 (5321): 2045-2047.
- [205] Proukakis C, Dudzik CG, Brier T, MacKay DS, Cooper JM, Millhauser GL et al. A novel alpha-synuclein missense mutation in Parkinson disease. *Neurology* 2013; 80 (11): 1062-1064.
- [206] Quadri M, Fang M, Picillo M, Olgiati S, Breedveld GJ, Graafland J et al. Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Hum Mutat* 2013; 34 (9): 1208-1215.
- [207] Ramirez-Valle F, Braunstein S, Zavadil J, Formenti SC, Schneider RJ. eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy. *J Cell Biol* 2008; 181 (2): 293-307.
- [208] Ramirez A, Heimbach A, Grundemann J, Stiller B, Hampshire D, Cid LP et al. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat Genet* 2006; 38 (10): 1184-1191.
- [209] Ramonet D, Podhajska A, Stafa K, Sonnay S, Trancikova A, Tsika E et al. PARK9-associated ATP13A2 localizes to intracellular acidic vesicles and regulates cation homeostasis and neuronal integrity. *Hum Mol Genet* 2012; 21 (8): 1725-1743.
- [210] Rana AQ, Siddiqui I, Yousuf MS. Challenges in diagnosis of young onset Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2012; 323 (1-2): 113-116.
- [211] Raquel Esteves A, Swerdlow RH, Cardoso SM. LRRK2, a puzzling protein: Insights into Parkinson's disease pathogenesis. *Exp Neurol* 2014;
- [212] Ren Y, Zhao J, Feng J. Parkin Binds to alpha /beta Tubulin and Increases their Ubiquitination and Degradation. *J Neurosci* 2003; 23 (8): 3316-3324.

- [213] Richardson S, Shaffer JA, Falzon L, Krupka D, Davidson KW, Edmondson D. Meta-analysis of perceived stress and its association with incident coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2012; 110 (12): 1711-1716.
- [214] Riley BE, Loughheed JC, Callaway K, Velasquez M, Brecht E, Nguyen L et al. Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nat Commun* 2013; 4 1982.
- [215] Rosengren A, Tibblin G, Wilhelmsen L. Self-perceived psychological stress and incidence of coronary artery disease in middle-aged men. *Am J Cardiol* 1991; 68 (11): 1171-1175.
- [216] Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K et al. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008; 63 (2): 167-173.
- [217] Ross OA, Soto-Ortolaza AI, Heckman MG, Aasly JO, Abahuni N, Annesi G et al. Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol* 2011; 10 (10): 898-908.
- [218] Ross OA, Wu YR, Lee MC, Funayama M, Chen ML, Soto AI et al. Analysis of Lrrk2 R1628P as a risk factor for Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008; 64 (1): 88-92.
- [219] Rothfuss O, Fischer H, Hasegawa T, Maisel M, Leitner P, Miesel F et al. Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. *Hum Mol Genet* 2009; 18 (20): 3832-3850.
- [220] Samaranch L, Lorenzo E, Pastor MA, Riverol M, Luquin MR, Rodriguez-Oroz MC et al. Analysis of the GIGYF2 gene in familial and sporadic Parkinson disease in the Spanish population. *Eur J Neurol* 2010; 17 (2): 321-325.
- [221] Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M et al. Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 2009; 41 (12): 1303-1307.
- [222] Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, Dawson TM. Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends Neurosci* 2014; 37 (6): 315-324.

- [223] Sekeff-Sallem FA, Barbosa ER. Diagnostic pitfalls in Parkinson's disease: case report. *Arq Neuropsiquiatr* 2007; 65 (2A): 348-351.
- [224] Sharma M, Maraganore DM, Ioannidis JP, Riess O, Aasly JO, Annesi G et al. Role of sepiapterin reductase gene at the PARK3 locus in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2011; 32 (11): 2108 e2101-2105.
- [225] Sharma M, Mueller JC, Zimprich A, Lichtner P, Hofer A, Leitner P et al. The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson's disease in European populations. *J Med Genet* 2006; 43 (7): 557-562.
- [226] Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; 25 (3): 302-305.
- [227] Shimura H, Hattori N, Kubo S, Yoshikawa M, Kitada T, Matsumine H et al. Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann Neurol* 1999; 45 (5): 668-672.
- [228] Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R et al. Ubiquitination of a New Form of alpha -Synuclein by Parkin from Human Brain: Implications for Parkinson's Disease. *Science* 2001; 293 (5528): 263-269.
- [229] Shin JH, Ko HS, Kang H, Lee Y, Lee YI, Pletinkova O et al. PARIS (ZNF746) repression of PGC-1alpha contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell* 2011; 144 (5): 689-702.
- [230] Shojaee S, Sina F, Banihosseini SS, Kazemi MH, Kalhor R, Shahidi GA et al. Genome-wide linkage analysis of a Parkinsonian-pyramidal syndrome pedigree by 500 K SNP arrays. *Am J Hum Genet* 2008; 82 (6): 1375-1384.
- [231] Schlitter AM, Kurz M, Larsen JP, Voitalla D, Muller T, Epplen JT et al. Parkin gene variations in late-onset Parkinson's disease: comparison between Norwegian and German cohorts. *Acta Neurol Scand* 2006; 113 (1): 9-13.

- [232] Schon EA, Przedborski S. Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* 2011; 70 (6): 1033-1053.
- [233] Schrag A, Ben-Shlomo Y, Brown R, Marsden CD, Quinn N. Young-onset Parkinson's disease revisited--clinical features, natural history, and mortality. *Mov Disord* 1998; 13 (6): 885-894.
- [234] Schrag A, Schott JM. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *Lancet Neurol* 2006; 5 (4): 355-363.
- [235] Schulz JB, Falkenburger BH. Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 2004; 318 (1): 135-147.
- [236] Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, Aharon-Peretz J, Annesi G, Barbosa ER et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009; 361 (17): 1651-1661.
- [237] Silvera D, Arju R, Darvishian F, Levine PH, Zolfaghari L, Goldberg J et al. Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. *Nat Cell Biol* 2009; 11 (7): 903-908.
- [238] Simon-Sanchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 2009; 41 (12): 1308-1312.
- [239] Simon-Sanchez J, Singleton AB. Sequencing analysis of OMI/HTRA2 shows previously reported pathogenic mutations in neurologically normal controls. *Hum Mol Genet* 2008; 17 (13): 1988-1993.
- [240] Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J et al. {alpha}-Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. *Science* 2003; 302 (5646): 841-.
- [241] Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord* 2013; 28 (1): 14-23.
- [242] Smith WW, Margolis RL, Li X, Troncoso JC, Lee MK, Dawson VL et al. {alpha}-Synuclein Phosphorylation Enhances Eosinophilic Cytoplasmic Inclusion Formation in SH-SY5Y Cells. *J Neurosci* 2005; 25 (23): 5544-5552.

- [243] Smith WW, Pei Z, Jiang H, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA. Kinase activity of mutant LRRK2 mediates neuronal toxicity. *Nat Neurosci* 2006; 9 (10): 1231-1233.
- [244] Spatola M, Wider C. Genetics of Parkinson's disease: the yield. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20 Suppl 1 S35-38.
- [245] Spica V, Pekmezovic T, Svetel M, Kostic VS. Prevalence of non-motor symptoms in young-onset versus late-onset Parkinson's disease. *J Neurol* 2013; 260 (1): 131-137.
- [246] Spiess C, Beil A, Ehrmann M. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 1999; 97 (3): 339-347.
- [247] Spillantini MG, Goedert M. Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 2013; 12 (6): 609-622.
- [248] Srivastava A, Tang MX, Mejia-Santana H, Rosado L, Louis ED, Caccappolo E et al. The relation between depression and parkin genotype: the CORE-PD study. *Parkinsonism Relat Disord* 2011; 17 (10): 740-744.
- [249] Staropoli JF, McDermott C, Martinat C, Schulman B, Demireva E, Abeliovich A. Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron* 2003; 37 (5): 735-749.
- [250] Stichel CC, Augustin M, Kuhn K, Zhu XR, Engels P, Ullmer C et al. Parkin expression in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci* 2000; 12 (12): 4181-4194.
- [251] Stochl J, Hagtvet KA, Brozova H, Klempir J, Roth J, Ruzicka E. Handedness does not predict side of onset of motor symptoms in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009; 24 (12): 1836-1839.
- [252] Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D et al. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2005; 14 (15): 2099-2111.
- [253] Sun M, Latourelle JC, Wooten GF, Lew MF, Klein C, Shill HA et al. Influence of Heterozygosity for Parkin Mutation on Onset Age in Familial Parkinson Disease: The GenePD Study. *Arch Neurol* 2006; 63 (6): 826-832.

- [254] Swinn L, Schrag A, Viswanathan R, Bloem BR, Lees A, Quinn N. Sweating dysfunction in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; 18 (12): 1459-1463.
- [255] Tan EK, Shen H, Tan LC, Farrer M, Yew K, Chua E et al. The G2019S LRRK2 mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 2005; 384 (3): 327-329.
- [256] Tan EK, Yew K, Chua E, Puvan K, Shen H, Lee E et al. PINK1 mutations in sporadic early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006; 21 (6): 789-793.
- [257] Tanaka K, Matsuda N. Proteostasis and neurodegeneration: the roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843 (1): 197-204.
- [258] Tassin J, Durr A, Bonnet AM, Gil R, Vidailhet M, Lucking CB et al. Levodopa-responsive dystonia. GTP cyclohydrolase I or parkin mutations? *Brain* 2000; 123 (Pt 6) 1112-1121.
- [259] Tayebi N, Callahan M, Madike V, Stubblefield BK, Orvisky E, Krasnewich D et al. Gaucher disease and parkinsonism: a phenotypic and genotypic characterization. *Mol Genet Metab* 2001; 73 (4): 313-321.
- [260] Tayebi N, Walker J, Stubblefield B, Orvisky E, LaMarca ME, Wong K et al. Gaucher disease with parkinsonian manifestations: does glucocerebrosidase deficiency contribute to a vulnerability to parkinsonism? *Mol Genet Metab* 2003; 79 (2): 104-109.
- [261] Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2007; 16 Spec No. 2 R183-194.
- [262] Tobin JE, Latourelle JC, Lew MF, Klein C, Suchowersky O, Shill HA et al. Haplotypes and gene expression implicate the MAPT region for Parkinson disease: the GenePD Study. *Neurology* 2008; 71 (1): 28-34.
- [263] Tsunemi T, Krainc D. Zn²⁺ dyshomeostasis caused by loss of ATP13A2/PARK9 leads to lysosomal dysfunction and alpha-synuclein accumulation. *Hum Mol Genet* 2014; 23 (11): 2791-2801.

- [264] Tucci A, Charlesworth G, Sheerin UM, Plagnol V, Wood NW, Hardy J. Study of the genetic variability in a Parkinson's Disease gene: EIF4G1. *Neurosci Lett* 2012; 518 (1): 19-22.
- [265] Twelves D, Perkins KS, Counsell C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; 18 (1): 19-31.
- [266] Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W et al. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 1995; 378 (6557): 632-635.
- [267] Usenovic M, Knight AL, Ray A, Wong V, Brown KR, Caldwell GA et al. Identification of novel ATP13A2 interactors and their role in alpha-synuclein misfolding and toxicity. *Hum Mol Genet* 2012a; 21 (17): 3785-3794.
- [268] Usenovic M, Tresse E, Mazzulli JR, Taylor JP, Krainc D. Deficiency of ATP13A2 leads to lysosomal dysfunction, alpha-synuclein accumulation, and neurotoxicity. *J Neurosci* 2012b; 32 (12): 4240-4246.
- [269] Uversky VN. A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *J Biomol Struct Dyn* 2003; 21 (2): 211-234.
- [270] Uversky VN, Li J, Fink AL. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem* 2001a; 276 (14): 10737-10744.
- [271] Uversky VN, Li J, Fink AL. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem* 2001b; 276 (47): 44284-44296.
- [272] Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S et al. Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science* 2004a; 304 (5674): 1158-1160.
- [273] Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M et al. 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.

- [274] Valente EM, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V et al. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004b; 56 (3): 336-341.
- [275] van de Warrenburg BPC, Lammens M, Lucking CB, Deneffe P, Wesseling P, Booij J et al. Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology* 2001; 56 (4): 555-557.
- [276] Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA et al. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol* 2003; 157 (11): 1015-1022.
- [277] van der Walt JM, Nicodemus KK, Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL et al. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2003; 72 (4): 804-811.
- [278] van Duijn CM, Dekker MC, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duisterma JJ, Snijders PJ et al. Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* 2001; 69 (3): 629-634.
- [279] Venderova K, Kabbach G, Abdel-Messih E, Zhang Y, Parks RJ, Imai Y et al. Leucine-Rich Repeat Kinase 2 interacts with Parkin, DJ-1 and PINK-1 in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2009; 18 (22): 4390-4404.
- [280] Venderova K, Park DS. Programmed cell death in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2 (8):
- [281] Vilarino-Guell C, Wider C, Ross OA, Dachsel JC, Kachergus JM, Lincoln SJ et al. VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89 (1): 162-167.
- [282] Vogiatzi T, Xilouri M, Vekrellis K, Stefanis L. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. *J Biol Chem* 2008; 283 (35): 23542-23556.
- [283] Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology* 2007; 27 (5): 494-506.

- [284] Walter U, Klein C, Hilker R, Benecke R, Pramstaller PP, Dressler D. Brain parenchyma sonography detects preclinical parkinsonism. *Mov Disord* 2004; 19 (12): 1445-1449.
- [285] Wan JY, Edwards KL, Hutter CM, Mata IF, Samii A, Roberts JW et al. Association mapping of the PARK10 region for Parkinson's disease susceptibility genes. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20 (1): 93-98.
- [286] Wang C, Ko HS, Thomas B, Tsang F, Chew KCM, Tay S-P et al. Stress-induced alterations in parkin solubility promote parkin aggregation and compromise parkin's protective function. *Hum Mol Genet* 2005a; 14 (24): 3885-3897.
- [287] Wang C, Tan JM, Ho MW, Zaiden N, Wong SH, Chew CL et al. Alterations in the solubility and intracellular localization of parkin by several familial Parkinson's disease-linked point mutations. *J Neurochem* 2005b; 93 (2): 422-431.
- [288] Wang L, Xie C, Greggio E, Parisiadou L, Shim H, Sun L et al. The chaperone activity of heat shock protein 90 is critical for maintaining the stability of leucine-rich repeat kinase 2. *J Neurosci* 2008; 28 (13): 3384-3391.
- [289] Wang X, Winter D, Ashrafi G, Schlehe J, Wong YL, Selkoe D et al. PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell* 2011; 147 (4): 893-906.
- [290] Weiner WJ. There is no Parkinson disease. *Arch Neurol* 2008; 65 (6): 705-708.
- [291] Wickremaratchi MM, Ben-Shlomo Y, Morris HR. The effect of onset age on the clinical features of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2009; 16 (4): 450-456.
- [292] Williams DR, Hadeed A, al-Din AS, Wreikat AL, Lees AJ. Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Mov Disord* 2005; 20 (10): 1264-1271.
- [293] Winder-Rhodes SE, Evans JR, Ban M, Mason SL, Williams-Gray CH, Foltynie T et al. Glucocerebrosidase mutations influence the natural history of Parkinson's disease in a community-based incident cohort. *Brain* 2013; 136 (Pt 2): 392-399.

- [294] Wong ESP, Tan JMM, Wang C, Zhang Z, Tay S-P, Zaiden N et al. Relative Sensitivity of Parkin and Other Cysteine-containing Enzymes to Stress-induced Solubility Alterations. *J Biol Chem* 2007; 282 (16): 12310-12318.
- [295] Yu S, Ueda K, Chan P. Alpha-synuclein and dopamine metabolism. *Mol Neurobiol* 2005; 31 (1-3): 243-254.
- [296] Zabetian CP, Hutter CM, Factor SA, Nutt JG, Higgins DS, Griffith A et al. Association analysis of MAPT H1 haplotype and subhaplotypes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2007; 62 (2): 137-144.
- [297] Zarate-Lagunes M, Gu WJ, Blanchard V, Francois C, Muriel MP, Mouatt-Prigent A et al. Parkin immunoreactivity in the brain of human and non-human primates: an immunohistochemical analysis in normal conditions and in Parkinsonian syndromes. *J Comp Neurol* 2001; 432 (2): 184-196.
- [298] Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004; 55 (2): 164-173.
- [299] Zhang Y, Gao J, Chung KKK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *PNAS* 2000; 97 (24): 13354-13359.
- [300] Zhang Y, Wang ZZ, Sun HM. Lack of association between p.Ser167Asn variant of Parkin and Parkinson's disease: a meta-analysis of 15 studies involving 2,280 cases and 2,459 controls. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012a; 159B (1): 38-47.
- [301] Zhang Y, Wang ZZ, Sun HM. Meta-analysis of the influence of Parkin p.Asp394Asn variant on the susceptibility of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2012b; 524 (1): 60-64.
- [302] Zhang Y, Wang ZZ, Sun HM. A meta-analysis of the relationship of the Parkin p.Val380Leu polymorphism to Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2013; 162B (3): 235-244.

- [303] Zhao T, De Graaff E, Breedveld GJ, Loda A, Severijnen LA, Wouters CH et al. Loss of nuclear activity of the FBXO7 protein in patients with parkinsonian-pyramidal syndrome (PARK15). *PLoS ONE* 2011; 6 (2): e16983.
- [304] Zhou CQ, Zhang JW, Wang M, Peng GG. Meta-analysis of the efficacy and safety of long-acting non-ergot dopamine agonists in Parkinson's disease. *J Clin Neurosci* 2014; 21 (7): 1094-1101.
- [305] Zhou W, Freed CR. DJ-1 Up-regulates Glutathione Synthesis during Oxidative Stress and Inhibits A53T {alpha}-Synuclein Toxicity. *J Biol Chem* 2005; 280 (52): 43150-43158.
- [306] Zimprich A, Benet-Pages A, Struhal W, Graf E, Eck SH, Offman MN et al. A mutation in VPS35, encoding a subunit of the retromer complex, causes late-onset Parkinson disease. *Am J Hum Genet* 2011; 89 (1): 168-175.

10. Přílohy

Příloha 1 - Strukturovaný dotazník, fenotypová charakteristika pacientů

Příloha 2 - Strukturovaný dotazník, fenotypová charakteristika kontrol

Příloha 1. Strukturovaný dotazník, fenotypová charakteristika pacientů

Dotazník - Parkinsonova nemoc	
<i>Centrum extrapyramidových onemocnění - Neurologická klinika UK 1.LF a VFN, Praha 2, Kateřinská 30</i>	
ID pacienta:	Jste: <input type="checkbox"/> pravák <input type="checkbox"/> levák <input type="checkbox"/> přeúčený levák na praváka
Jméno a příjmení: _____ Datum narození: _____ Mobil: _____	
Počátek onemocnění	
▶ První projevy Parkinsonovy nemoci se u Vás objevily v roce:	_____
▶ Parkinsonova nemoc byla u Vás diagnostikována lékařem v roce:	_____
▶ Hybné projevy Parkinsonovy nemoci u Vás začaly dříve na:	<input type="checkbox"/> levé straně těla <input type="checkbox"/> pravé straně těla <input type="checkbox"/> na obou stranách stejně
První příznak(y) Parkinsonovy nemoci byl(y): <i>(zaškrtněte <u>pouze</u> projev či projevy, které se objevily <u>na začátku</u> onemocnění)</i>	
▶ ztuhlost či neobratnost končetiny, prstů nebo šije	<input type="checkbox"/>
▶ bolesti kloubů, ramen, končetin, zad, apod.	<input type="checkbox"/>
▶ třes končetin, hlavy či trupu	<input type="checkbox"/>
▶ mimovolní nepříjemné stáčení (křeče) prstů, končetin, šije či trupu	<input type="checkbox"/>
▶ mimovolní svírání víček	<input type="checkbox"/>
▶ křeče ruky během psaní	<input type="checkbox"/>
▶ porucha písma (<i>malé, špatně čitelné písmo, apod.</i>)	<input type="checkbox"/>
▶ porucha řeči (<i>tichá či nesrozumitelná řeč, horší vyjadřování, apod.</i>)	<input type="checkbox"/>
▶ porucha spánku (<i>problémy s usínáním, časté buzení, nespavost</i>)	<input type="checkbox"/>
▶ porucha nálady (<i>deprese, úzkost</i>)	<input type="checkbox"/>
▶ poruchy paměti (<i>zapomínání, potíže s vybavováním slov, apod.</i>)	<input type="checkbox"/>
▶ pocit únavy či nevykonnosti	<input type="checkbox"/>
▶ sexuální obtíže (<i>poruchy erekce, ejakulace, apod.</i>)	<input type="checkbox"/>
▶ výrazná zácpa	<input type="checkbox"/>
▶ náhlý pocit točení hlavy či nevolnosti po postavení z lehu či sedu	<input type="checkbox"/>
▶ jiné (<i>prosím napište</i>):	

Osobní anamnéza					
▶ kouření nyní	<input type="checkbox"/> ANO	<input type="checkbox"/> NE	počet (za den)	doba aktivního kouření (roky)	
▶ kouření v minulosti	<input type="checkbox"/> ANO	<input type="checkbox"/> NE	počet (za den)	doba aktivního kouření (roky)	rok ukončení
▶ důvod ukončení kouření	<input type="checkbox"/> zdravotní důvody		<input type="checkbox"/> ztráta chuti na cigaretu	<input type="checkbox"/> jiné:	
▶ káva	<input type="checkbox"/> ANO	<input type="checkbox"/> NE	počet šálků (za den)		
▶ práce (kdykoli během života)	<input type="checkbox"/> v zemědělství od roku: počet let:		<input type="checkbox"/> s ředidly a laky od roku: počet let:	<input type="checkbox"/> v chemickém průmyslu od roku: počet let:	

Rodinná anamnéza		
▶ Vyskytuje/vyskytla se u někoho ve Vaší rodině <u>PARKINSONOVA NEMOC</u> ?	<input type="checkbox"/> ANO	<input type="checkbox"/> NE
▶ Pokud ANO, u koho?		
▶ Vyskytuje/vyskytl se u někoho ve Vaší rodině <u>TŘES</u> ?	<input type="checkbox"/> ANO	<input type="checkbox"/> NE
▶ Pokud ANO, u koho?		

Příbuzenský vztah k jinému probandovi ve studii		
▶ Vyšetřovaný je příbuzný dalších probandů ve studii EOPD -	(číslo probanda/ů)	(uved'te druh příbuzenského vztahu probanda/ů k vyšetřovanému)

Motorické projevy	výskyt nyní či v minulosti	první výskyt od začátku PN (roky)
▶ tremor (končetiny, hlava či trup)	<input type="checkbox"/>	
▶ rigidita (končetiny, šíje či trupu)	<input type="checkbox"/>	
▶ hypokineze, bradykineze (zpomalení a nižší rozsah pohybů)	<input type="checkbox"/>	
▶ porucha řeči	<input type="checkbox"/>	
▶ mikrografie	<input type="checkbox"/>	
▶ fokální dystonie (končetiny, blefarospasmus, grafospasmus)	<input type="checkbox"/>	
	lokalizace:	
▶ porucha chůze, krátký, šouravý krok	<input type="checkbox"/>	
▶ freezing a hesitace	<input type="checkbox"/>	
▶ pády při chůzi	<input type="checkbox"/>	
▶ motorické projevy jsou nyní horší na:	<input type="checkbox"/> levé straně těla <input type="checkbox"/> pravé straně těla <input type="checkbox"/> na obou stranách stejně	

Non-motorické projevy (NMSS- 30)	tíže	četnost	první výskyt od začátku PN (roky)
<ul style="list-style-type: none"> tíže: 0 – žádná // 1 – mírná, symptomy jsou přítomny, ale pacientovi činí minimální obtíže // 2- střední, symptomy do určité míry pacienta obtěžují // 3- těžká, hlavní zdroj obtíží nebo postižení pacienta četnost: 1 = zřídka (méně než 1x za týden) // 2 = občas (1x týdně) // 3 = často (několikrát týdně) // 4 = velmi často (denně nebo neustále) 			
▶ Kardiovaskulární obtíže			
- Prodělal pacient pocit omámenosti, závrať nebo slabost při vstávání ze sedu nebo z lehu? + (UPDRS IV)			
- Upadl pacient v důsledku mdloby nebo ztráty vědomí?			
▶ Spánek / únava			
- Stává se pacientovi, že během denních aktivit neúmyslně dřímá nebo usne? (např. během rozhovoru, jídla, při sledování televize nebo při čtení)			
- Omezuje pacienta během dne únava či nedostatek energie (není tím myšlena zpomalenost)?			
- Má pacient obtíže s usínáním či udržením spánku? + (UPDRS IV)			
- Mívá pacient v klidu vsedě nebo vleže nutkání k pohybům nohama či neklid v nohou, který se zlepšuje s pohybem?			
▶ Nálada / kognice			
- Ztrácí pacient zájem o okolí?			
- Ztrácí pacient zájem o činnost a chybí mu motivace k zahájení nových aktivit?			

- Pociťuje pacient bezdůvodně nervozitu či obavy?			
- Zdá se být pacient smutný či depresivní nebo udává podobné pocity?			
- Má pacient oploštělou náladu bez běžného kolísání dobré a špatné nálady?			
- Má pacient obtíže s prožíváním radosti při běžných aktivitách nebo udává nedostatek radosti?			
► Percepční problémy / halucinace			
- Udává pacient, že vidí věci, které na daném místě ve skutečnosti nejsou?			
- Má pacient utkvělé představy, o kterých víte, že nejsou pravdivé? (např.: že byl poškozen, okraden nebo podváděn)			
- Má pacient dvojité vidění? (dva oddělené obrazy předmětu, není tím myšleno rozmazané vidění)			
► Pozornost/paměť			
- Má pacient problémy s udržením pozornosti během činností? (např. při čtení či rozhovoru)			
- Zapomíná pacient věci, které byly řečeny před chvílí či události, které se staly v posledních několika dnech?			
- Zapomíná pacient udělat věci? (Např. užít léky, vypnout domácí spotřebiče)			
► Zaživací trakt			
- Slintá pacient během dne?			
- Má pacient polykací obtíže?			
- Trpí pacient zácpou? (vyprazdňování méně než 3-krát týdně)			
- Trpí pacient nechutenstvím, nevolností či zvracením? (UPDRS IV)	<input type="checkbox"/> ANO <input type="checkbox"/> NE		
► Močení			
- Má pacient potíže s udržením moči? (Urgence)			
- Musí se pacient vymočit do dvou hodin od posledního močení? (Četnost)			
- Musí pacient pravidelně v noci vstávat, aby se vymočil? (Nykturie)			
► Sexuální funkce			
- Pociťuje pacient změnu v zájmu o sex? (Výrazně zvýšený nebo snížený, podtrhněte)			
- Má pacient problémy při sexu?			
► Různé			
- Má pacient bolesti nevysvětlitelné jinou příčinou? (souvisejí s bráním léků a úleva nastává po užití antiparkinsonik?)			
- Udává pacient změnu chuti nebo čichu?	<input type="checkbox"/> chuť <input type="checkbox"/> čich		

- Udává pacient změnu hmotnosti v poslední době? (nesouvisející s dietou)			
	<input type="checkbox"/> hubnutí	<input type="checkbox"/> nadváha	
- Udává pacient nadměrné pocení? (Nesouvisející s horkým počasím)			
▶ Sleep benefit na začátku onemocnění	<input type="checkbox"/> výrazný	<input type="checkbox"/> mírný	<input type="checkbox"/> žádný
▶ Sleep benefit nyní	<input type="checkbox"/> výrazný	<input type="checkbox"/> mírný	<input type="checkbox"/> žádný

Dyskineze	výskyt nyní či v minulosti	první výskyt od začátku PN (roky)
▶ peak-of-dose	<input type="checkbox"/>	
▶ bifázické	<input type="checkbox"/>	
▶ off dystonie (ranní dystonie) (UPDRS IV)	<input type="checkbox"/>	
▶ jak velkou část doby bdění jsou dyskineze přítomny (UPDRS IV)	<input type="checkbox"/> 0% <input type="checkbox"/> 26 - 50% dne <input type="checkbox"/> > 76 % dne	<input type="checkbox"/> 1 - 25% dne <input type="checkbox"/> 51 - 75% dne
▶ do jaké míry dyskineze zneschopňují (UPDRS IV)	<input type="checkbox"/> vůbec <input type="checkbox"/> středně <input type="checkbox"/> zcela	<input type="checkbox"/> mírně <input type="checkbox"/> těžce
▶ do jaké míry mohou být dyskineze bolestivé (UPDRS IV)	<input type="checkbox"/> vůbec <input type="checkbox"/> středně <input type="checkbox"/> velmi silně	<input type="checkbox"/> mírně <input type="checkbox"/> silně

Fluktuace hybnosti	výskyt nyní či v minulosti	první výskyt od začátku PN (roky)
▶ wearing-off (UPDRS IV)	<input type="checkbox"/>	
▶ nepředvídatelné on-off stavy (UPDRS IV)	<input type="checkbox"/>	
▶ náhlé on-off stavy, přicházející během několika sekund (UPDRS IV)	<input type="checkbox"/>	
▶ off stavy během noci při probuzení	<input type="checkbox"/>	
▶ ranní akineze	<input type="checkbox"/>	
▶ jako část dne je průměrně pacient v off stavu? (UPDRS IV)	<input type="checkbox"/> 0% <input type="checkbox"/> 26 - 50% dne <input type="checkbox"/> > 76 % dne	<input type="checkbox"/> 1 - 25% dne <input type="checkbox"/> 51 - 75% dne

Terapie	užívání kdykoli	užívání i nyní	poprvé nasazen od začátku PN (roky)
▶ První nasazený lék byl:			
▶ L-DOPA (Isicom / Nakom / Madopar)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
▶ L-DOPA - současná dávka:	_____		mg /den
▶ Agonista dopaminu (Mirapexin / Requip / Permax)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
▶ Agonista dopaminu - současná dávka:	_____		název
	_____		mg /den
▶ DBS	<input type="checkbox"/> ANO	<input type="checkbox"/> NE	
▶ Odpovídavost na léčbu na začátku onemocnění:	<input type="checkbox"/> výborná	<input type="checkbox"/> průměrná	<input type="checkbox"/> nízká
▶ Odpovídavost na léčbu nyní:	<input type="checkbox"/> výborná	<input type="checkbox"/> průměrná	<input type="checkbox"/> nízká

Stadium podle Hoehnové a Yahra	
<p>0 - bez příznaků nemoci // 1 - jednostranné příznaky // 1,5 - jednostranné příznaky + axiální postiž. // 2 - oboustranné postižení + poruchy rovnováhy // 2,5 - oboustranné postižení s mírnou poruchou rovnováhy, schopen vyrovnat stoj po zkoušce zvrácení trupu // 3 - mírné až středně těžké postižení, posturální instabilita, soběstačný // 4 - těžká nezpůsobilost, ještě schopen chodit nebo stát bez pomoci // 5 - odkázán na vozík nebo upoután na lůžko, vstává jen s pomocí</p>	
▶ Současné stadium Parkinsonovy nemoci dle Hoehnové a Yahra:	

Datum: _____

Dotazník vyplnil: _____

Příloha 2. Strukturovaný dotazník, fenotypová charakteristika kontrol

Dotazník - genetická banka kontrol

Neurologická klinika UK 1.LF a VFN, Praha 2, Kateřinská 30

ID probanda:	Later: <input type="checkbox"/> pravák <input type="checkbox"/> levák <input type="checkbox"/> přeúčený levák na praváka
--------------	--

Jméno a příjmení: _____ R.č.: _____ Mobil: _____

Adresa: _____ Tel: _____ Email: _____

Osobní anamnéza

▶ Výška:		▶ Váha:		▶ Pohlaví:	
▶ Problémy při porodu	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO (uved'te jaké):			
▶ Poruchy PM vývoje	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO (uved'te jaké):			
▶ Operace	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO (uved'te jaké):			
▶ Jiné hospitalizace (v minulosti)	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO (uved'te důvod):			
▶ Alergie / autoimunita	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO (uved'te jaké):			
▶ Pravidelná medikace	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO (uved'te názvy léků):			
▶ Vzdělání	<input type="checkbox"/> ZŠ <input type="checkbox"/> SŠ <input type="checkbox"/> VŠ	▶ Počet let školní docházky:			
▶ Současné povolání:					

Rodinná anamnéza

▶ Matka	(věk / věk při ↑ / nemoci):				
▶ Otec	(věk / věk při ↑ / nemoci):				
▶ Sourozenci:	(počet):	(věk / věk při ↑ / nemoci):			
▶ Děti:	(počet):	(věk / věk při ↑ / nemoci):			
▶ Potraty dětí:	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO (počet):	▶ Časté potraty v rodině:	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO

Neurologická onemocnění	proband		v rodině	
	NE	ANO	NE	ANO (uvedte kdo)
▶ Parkinsonova nemoc / syndrom	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Třes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Dystonie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Myoklonus, choera	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Tiky / Touretteův syndrom	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Demence (např. Alzheimer)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Roztroušená skleróza	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Epilepsie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Migréna	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Syndrom neklidných nohou	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Narkolepsie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Insomnie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Cévní mozková příhoda	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Nádor mozku / míchy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Infekce CNS (meningitida, encefalitida, borelióza)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> (uvedte jaké):		
▶ Trauma CNS, bezvědomí	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> (uvedte jaké):		
▶ Intoxikace CNS (léky, houby, CO, chemikálie, ad.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> (uvedte jaké):		
▶ Sledování na neurologii	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> (uvedte proč):		

Psychiatrická onemocnění	proband		v rodině	
	NE	ANO	NE	ANO (uvedte kdo)
▶ Depresivní porucha	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Úzkostná porucha	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Psychotické onemocnění (shizofrenie)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ ADHD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ OCD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Kóktavost	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Poruchy příjmu potravy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Alkoholismus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Drogová závislost	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Gamblerství	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Suicidium či pokus o něj	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Sledování na psychiatrii	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> (uvedte proč):		

Další onemocnění	proband		v rodině	
	NE	ANO	NE	ANO (uvedte kdo)
▶ Vysoký krevní tlak	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ ICHS, AIM	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ DM I. typu (cukrovka od dětství, insulin)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ DM II. typu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Anémie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Onemocnění štítné žlázy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Tumor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> (kde):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> (kde):
▶ Jiná onemocnění pacienta	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> (uvedte jaká):		
▶ Jiná onemocnění opakovaně v rodině	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> (uvedte jaká):		

Rizika					
▶ Práce (kdykoli během života)	<input type="checkbox"/> v zemědělství počet let:		<input type="checkbox"/> s ředidly a laky počet let:		<input type="checkbox"/> v chemickém průmyslu počet let:
▶ Kouření	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO	počet (za den)	doba aktivního kouření (roky)	abstinence (roky)
▶ Důvod ukončení kouření	<input type="checkbox"/> zdravotní důvody		<input type="checkbox"/> ztráta chuti na cigaretu		<input type="checkbox"/> jiné:
▶ Káva	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO	počet šálků (za den)		
▶ Marihuana	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO	▶ Drogy	<input type="checkbox"/> NE	<input type="checkbox"/> ANO (jaké):

Neurologické vyšetření		norm.	patol. (specifikujte nález)
▶ Hlava, mozkové nervy, řeč		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Krk a šíje (včetně rigidity)		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Hrud' a břicho		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Horní končetiny (včetně rigidity a hypokineze)		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Dolní končetiny (včetně rigidity a hypokineze)		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ Páteř, stoj a chůze		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
▶ MMSE:		▶ Další spolupráce	<input type="checkbox"/> ANO <input type="checkbox"/> NE

Datum: _____

Dotazník vyplnil: _____