

**Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta  
UK v Martine**

# **Parkinsonova choroba I**

**Martin Kolísek**

**2018**

## **Parkinsonova choroba I**

Autor: RNDr. Martin Kolísek, Dr.rer.nat.(Genet.): Univerzita Komenského v Bratislave,  
Jesseniova lekárska fakulta UK v Martine, Martinské centrum pre biomedicínu, Divízia  
neurovedy

Recenzenti:

prof. MUDr. Egon Kurča, PhD.

doc. RNDr. Stanislav Stuchlík, CSc.

Prvé vydanie (2018)

Vydavateľ: Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine

ISBN 978-80-8187-048-4

# I. Predslov

O Parkinsonovej chorobe, alebo v širšom zmysle o parkinsonizme už boli napísané mnohé vynikajúce vedecké práce. Napriek tomu sa téme Parkinsonovej choroby v kontexte najnovších poznatkov molekulárnej medicíny a biológie venuje v odbornej komunite, ale aj v laickej verejnosti veľmi malá pozornosť.

Vysokoškolské skriptá „Parkinsonova choroba I“ sú prvým dielom z planovaných troch dielov, ktoré majú slúžiť ako doplnkový štúdijný materiál prinášajúci najnovšie, komplexné informácie o Parkinsonovej chorobe predovšetkým pre študentov postgraduálneho štúdia v odbore neurológia, lekárska genetika a molekulová medicína a biochémia, lekárov v špecializačnej príprave v týchto odboroch, lekárov špecialistov (neurológov, klinických genetikov), genetických poradcov, farmaceutov a vedeckých pracovníkov z oblasti neurovied. Prvý diel prináša: (1) súhrn najnovších klinicky-relevantných informácií o Parkinsonovej chorobe, (2) objasnenie všeobecných genetických princípov v dedičnosti Parkinsonovej choroby, (3) konkrétne príklady typov dedičnosti Parkinsonovej choroby, (4) informácie o faktoroch komplikujúcich genetickú analýzu dedičnosti Parkinsonovej choroby, a (5) prehľad génov/proteínov asociovaných s autozomálne dominantnou formou Parkinsonovej choroby a popis ich zapojenia do fyziologických, respektíve patofyziologických procesov v bunkách. V nasledujúcich dieloch sa budeme venovať: (1) génom/proteínom, ktoré sú asociované s autozomálne recesívnou formou Parkinsonovej choroby, (2) epigenetike Parkinsonovej choroby, (3) mitochondriálnej homeostáze, mitofágii/autofágii a oxidatívne stresu v etiopatogenéze Parkinsonovej choroby a (4) metódam molekulárnej diagnostiky Parkinsonovej choroby.

Parkinsonova choroba je vnímaná ako nevyliciteľný progredujúci neurodegeneratívny stav s pomerne heterogénnou symptomatikou, etiopatogenezou a genetickým pozadím. Paleta neurologických komplikácií siaha od porušenia motorických funkcií až po deklináciu kognitívnych schopností pacientov, čím sa častokrát prekrýva s inými neurodegeneratívnymi ochoreniami.

Rozdelenie neurodegeneratívnych ochorení na skupinu tauopatií, kam patrí Alzheimerova choroba a skupinu synukleinopatií kam patrí Parkinsonova choroba, sa vo svetle najnovších poznatkov javí zastarané. Dôvodom je fakt, že tak Parkinsonova, ako aj Alzheimerova choroba môžu a často aj majú „hybridnú“ fenotypovú manifestáciu. Tým sa potiera pomyselná, jasne vymedzená hranica medzi uvedenými patologickými stavmi. Z toho

dôvodu, orientovať sa v množstve na prvý pohľad komplikovaných a niekedy až zmätočných informácií o Parkinsonovej chorobe nie je práve jednoduché.

Dúfam, že informácie, ktoré sú obsiahnuté v týchto skriptách napomôžu zorientovať sa v danej problematike a možno vyprovokujú hlbší záujem o toto z vedeckého pohľadu fascinujúce, no pre pacienta vážne neurodegeneratívne ochorenie.

Záverom si dovoľím vysloviť pranie, aby sa v budúcnosti o Parkinsonovej chorobe hovorilo ako o vyliečiteľnom neurologickom ochorení. Verím, že k dosiahnutiu tohoto cieľa môžu prispieť aj mnohí čitatelia týchto skrípt.

## II. PodĎakovanie

Moje podĎakovanie patrí predovšetkým mojím výnimočným kolegom a priateľom Mgr. Ivane Pilchovej, PhD. a MUDr. Michalovi Cibulkovi, bez ktorých by zrod týchto skrípt bol bolestne komplikovanou záležitosťou. Každý deň v práci s Vami je potešením a je mi ct'ou bádať a boríť sa s realitou slovenskej vedy práve s Vami.

Ďalej ďakujem doc. RNDr. Vladimírovi Ferákovi, CSc. za množstvo vecných a konštruktívnych pripomienok k obsahu skrípt.

Chcem sa podĎakovať aj Mgr. Danielovi Filipovi, ktorého mierne mrazivý anglický humor dokáže urobiť úsmevnú záležitosť aj z opisu autofágie alebo retroméru. Ďalej ďakujem MUDr. Ľudovítovi Jurečkovi, PhD. za jeho úspešné sekundovanie Mgr. Filipovi a jeho nákazlivý a len ťažko opísateľný smiech. V neposlednej rade ďakujem pani prof. MUDr. Gabriele Nosál'ovej, DrSc. za dávky staminy, motivačnej energie a cenných rád, bez ktorých by bola moja plavba „vodami slovenskej biomedicíny“ zrejme omnoho turbulentnejšia a prof. MUDr. Dušanovi Dobrotovi, CSc. a prof. RNDr. Petrovi Račayovi, CSc. za vytvorenie stimulujúcich pracovných podmienok.

Záverom ďakujem Ing. Lucii Ráhel'ovej za jazykové korektúry a svojej rodine a najbližším za podporu a pochopenie počas práce na týchto skriptách.

### **III. Obsah**

<b>1.</b>	<b>Historické pozadie a definícia Parkinsonovej choroby</b>	<b>9</b>
<b>1.1.</b>	<b>Epidemiologická charakteristika Parkinsonovej choroby</b>	<b>12</b>
<b>1.1.1.</b>	<b>Incidencia a prevalencia Parkinsonovej choroby</b>	<b>12</b>
<b>1.1.2.</b>	<b>Mortalita a prežívanie pacientov s Parkinsonovou chorobou</b>	<b>13</b>
<b>1.1.3.</b>	<b>Epidemiologická situácia na Slovensku</b>	<b>14</b>
<b>1.2.</b>	<b>Etio patogenéza Parkinsonovej choroby</b>	<b>14</b>
<b>1.2.1.</b>	<b>Prionovému ochoreniu podobná propagácia <math>\alpha</math>-synukleínu</b>	<b>18</b>
<b>1.2.2.</b>	<b>Mitochondriálna dysfunkcia</b>	<b>19</b>
<b>1.2.3.</b>	<b>Oxidatívny stres</b>	<b>20</b>
<b>1.2.4.</b>	<b>Neuroinflamácia</b>	<b>20</b>
<b>1.2.5.</b>	<b>Patofyziologické aspekty motorického deficitu</b>	<b>21</b>
<b>1.3.</b>	<b>Klinický obraz a diagnostika Parkinsonovej choroby</b>	<b>21</b>
<b>1.4.</b>	<b>Zobrazovacie a laboratórne metódy v diagnostike Parkinsonovej choroby</b>	<b>24</b>
<b>1.5.</b>	<b>Terapeutické možnosti v manažmente Parkinsonovej choroby</b>	<b>25</b>
<b>1.5.1.</b>	<b>Hlboká mozgová stimulácia</b>	<b>26</b>
<b>2.</b>	<b>Genetika Parkinsonovej choroby</b>	<b>28</b>
<b>2.1.</b>	<b>Genetická klasifikácia Parkinsonovej choroby</b>	<b>28</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>Genetické princípy a výnimky z genetických princípov v Parkinsonovej chorobe</b>	<b>30</b>
<b>2.1.2.</b>	<b>Praktické problémy pri genetickej analýze familiárnej formy Parkinsonovej choroby</b>	<b>34</b>
<b>2.1.2.1.</b>	<b>Autozomálne dominantná dedičnosť Parkinsonovej choroby s variabilnou penetranciou</b>	<b>35</b>
<b>2.1.2.2.</b>	<b>Autozomálne recesívna dedičnosť Parkinsonovej choroby s variabilnou penetranciou</b>	<b>36</b>

2.1.2.3.	Na X chromozóm naviazaný recesívny typ dedičnosti Parkinsonovej choroby (na X-chromozóm naviazaná dystónia/parkinsonizmus)	38
2.1.2.4.	Na X chromozóm viazaný dominantný typ dedičnosti Parkinsonovej choroby	40
2.1.2.5.	Autozomálne dominantná dedičnosť Parkinsonovej choroby v ženskej línii	41
2.1.2.6.	Genetické poradenstvo	42
2.1.2.7.	Fenokópie ako faktor komplikujúci genetickú analýzu	43
3.	Gény asociované s autozomálne dominantnou formou Parkinsonovej choroby	48
3.1.	$\alpha$ -Synukleín (SNCA)/PARK1(4)	48
3.2.	“Leucine Rich Repeat“ kináza 2 (LRRK2)/PARK8	51
3.3.	“Vacuolar Protein Sorting” asociovaný proteín 35 (VPS35)/PARK17	52
3.3.1.	Retromér v Parkinsonovej chorobe	54
3.4.	Ubiquitín karboxyl-terminálna hydroláza L1 (UCHL1)/PARK5	58
3.5.	Glukocerebrozidáza (GBA1)	61
4.	Literatúra	64
	Apendix 1 / Odstupňovanie („staging“) mozgovej patológie typickej pre idiopatickú (sporadickú) formu PD podľa Braaka <i>et al.</i> , 2003	77
	Apendix 2 / Nigrálne a extranigrálne príznaky PD	78
	Apendix 3 / Motorické, neuropsychiatrické a autonómne a senzitivne komplikácie súvisiace s PD, alebo liečbou ochorenia	79
	Apendix 4 / Aminokyseliny (A – C)	81
	Apendix 5 / Stručné pravidlá popisu sekvenčných variant podľa HGVS (Human Genome Variation Society) 2016	86

*Cognoscere prudentem,  
Sapiens vivet,  
Sapiens morietur!*



# 1. Historické pozadie a definícia Parkinsonovej choroby

Parkinsonova choroba bola známa už v dobách staroveku. V Ayurvéde, starovekom indickom medicínskom systéme, bola Parkinsonova choroba známa ako Kampavata, ba čo viac existujú historické dôkazy, že bola systematicky liečená takzvanou zamatovou fazuľou, čo sú plody rastliny *Mucuna pruriens* (Obrázok 1.1). Zamatová fazuľa obsahuje levodopu ako priamy prekursor neurotransmiteru dopamínu. V systéme starodávnej európskej medicíny bola Parkinsonova choroba opísaná rímskym lekárom Aeliom Galenom (okolo roku 175 n. l.) ako trasľavka, charakterizovaná pokojovým tremorom, zhrbeným postojom a paralýzou. Prvá systematická práca publikovaná na tému Parkinsonovej choroby však pochádza až z roku 1887 ([www.parkinsons.org](http://www.parkinsons.org), [www.atrainceu.com](http://www.atrainceu.com)).

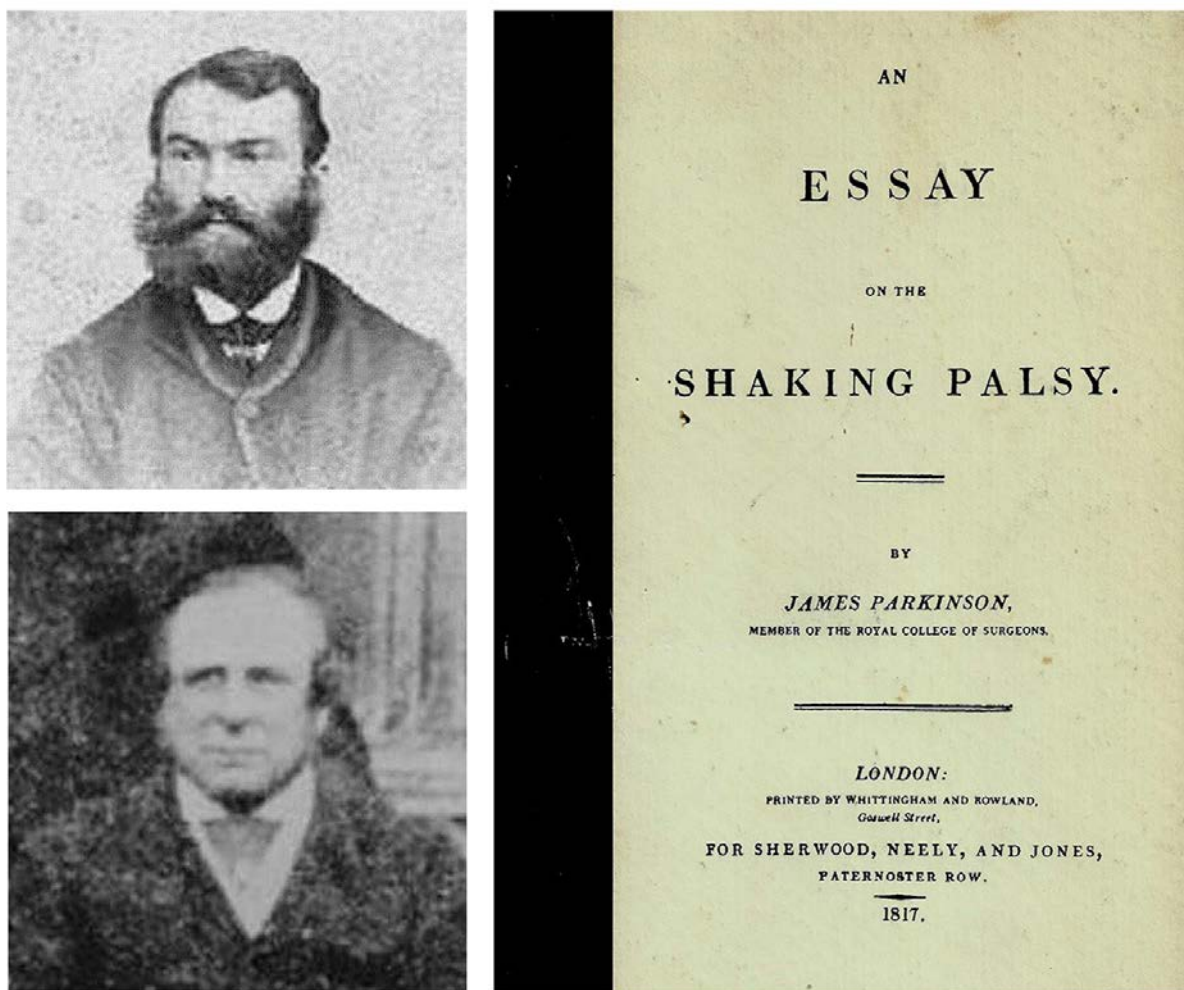


**Obrázok 1.1:** Zamatová fazuľa (*Mucuna pruriens*). Obrázky boli prevzaté z <http://www.herbosophy.com.au> a [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org).

V roku 2017 uplynulo 200 rokov, odkedy James Parkinson publikoval priekopnícku prácu „*Essay on the shaking palsy*“ (Parkinson, 1817; Obrázok 1.2). Parkinson v tomto článku zhrnul svoje poznatky a pozorovania šiestich ľudí, pričom opísal významnú časť klinických prejavov ochorenia, ktoré dodnes nesie jeho meno. Kto však bol James Parkinson?

James Parkinson sa narodil v roku 1755 v Londýne. Okrem medicíny sa s veľkou vášňou venoval aj paleontológii, geológii a politike, v ktorej bol mimoriadne aktívny. Práve po odchode z politického života sa Parkinson začal naplno venovať praktickej medicíne, čo

viedlo ku vydaniu niekoľkých vedeckých prác. Tou najslávnejšou je už spomínaná *Essay on the shaking palsy*, publikovaná v roku 1817. Parkinson v nej opisuje príznaky u svojich pacientov (Parkinson, 1817). Autor v práci upozornil na degeneratívny charakter ochorenia a popísal typické parkinsonské držanie tela, „šuchtavú“ chôdzu a charakter tremoru. Najmä tremor bol v tých časoch nedostatočne opísaný a pochopený. Často bol spájaný skôr so záchvatovými stavmi. James Parkinson pomenoval popísané ochorenie ako „Shaking palsy“ alebo „*Paralysis agitans*“.



**Obrázok 1.2:** Na obrázku sú zobrazené fotografie, ktoré sú častokrát mylne považované za portréty Dr. Jamesa Parkinsona (1755-1824), pričom jeho originálny portrét sa dodnes nezachoval. Fotografie v skutočnosti zobrazujú Jamesa Cumine Parkinsona (vľavo hore, 1832-1887) a tajomníka britskej asociácie zubárov Jamesa Parkinsona (vľavo dole, fotografia z roku 1872). Na obrázku je aj titulná strana diela „*An Essay on the shaking palsy*“, ktorá bola vydaná v roku 1817. (Upravené podľa [searching4james.wordpress.com](http://searching4james.wordpress.com) a Arquivos de Neuro-Psiquiatria ISSN 1678-4227).

Jean-Martin Charcot, otec modernej neurológie, v roku 1861 študoval a detailnejšie popísal klinické prejavy tohto ochorenia a navrhol taktiež názov „Parkinson’s disease“

(Parkinsonova choroba, PD). Ochorenie charakterizoval ako neurologickú poruchu spojenú s tremorom, svalovou rigiditou a spomalenými pohybmi (Rodriguez-Violante *et al.*, 2017). V roku 1912 americký neurológ s nemeckými koreňmi Frederick Henry Lewy objavil a popísal intraneuronálne inklúzie v mozgoch pacientov s PD. Tieto inklúzie boli neskôr na jeho počesť pomenované Lewyho telieska. Ich prítomnosť sa stala jedným z diagnostických znakov PD (Rodriguez e Silva *et al.*, 2010). Krátko na to v roku 1919 opísal ruský neuropatológ Konstantin Nikolajevič Tretiakov vo svojej doktorskej práci poškodenie neurónov *substantia nigra* u pacientov s PD, čím objavil morfológický korelát ochorenia (Lees *et al.*, 2008).

O ďalšie takmer štyri desaťročia neskôr identifikovali Kathleen Montagu a Arvid Carlsson nezávisle na sebe dopamín ako neurotransmiter. Zníženú koncentráciu dopamínu v určitých oblastiach mozgu u pacientov s PD popísal v roku 1960 Oleh Hornykiewicz (Ehringer a Hornykiewicz, 1960). Tento autor vyslovil predpoklad, že práve zvýšenie hladiny dopamínu by mohlo viesť ku klinickému zlepšeniu. Už vtedy bolo známe, že dopamín neprechádza hemato-encefalickou bariérou, a preto ako perspektívnu terapiu navrhol prekursor dopamínu DOPA (di-hydroxy-fenyl alanín), ktorý sa do centrálného nervového systému (CNS) z krvného obehu dostať môže. Väčšina vtedajšej odbornej verejnosti však bola voči tejto hypotéze skeptická. Rok 1967 bol preto prelomovým rokom najmä pre samotných pacientov. V tomto roku George Cotzias demonštroval efekt liečiva L-DOPA (levodopa) na motorické symptómy pacientov s PD (Cotzias *et al.*, 1967). Odpoveď (responzivita) na L-DOPA sa stala jednou z charakteristík ochorenia. Koncom minulého milénia bola prvý krát identifikovaná genetická príčina u niektorých prípadov PD. Išlo o mutácie v géne *SNCA*, ktorý kóduje  $\alpha$ -synukleín (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Začiatkom druhej dekády 21. storočia bolo prostredníctvom GWAS (“genome-wide association study“) identifikovaných viacero lokusov ako rizikových pre vznik PD. Parkinsonova choroba je dnes považovaná za multisystémové ochorenie charakterizované parkinsonizmom, prítomnosťou Lewyho teliesok, stratou neurónov v *substantia nigra*, deficitom neurotransmiterov (najmä dopamínu), prítomnosťou genetických rizikových faktorov a zlepšením klinického obrazu po dopaminergnej terapii (Rodriguez-Violante *et al.*, 2017). Rok 2017 má v súvislosti s PD význam aj z dôvodu predstavenia nových aktualizovaných usmernení (“guidelines“) inštitútom NICE (“National Institute of Health and Care Excellence“) pre diagnostiku a terapiu PD (“NICE guideline“ NG71, 2017).

## 1.1. Epidemiologická charakteristika Parkinsonovej choroby

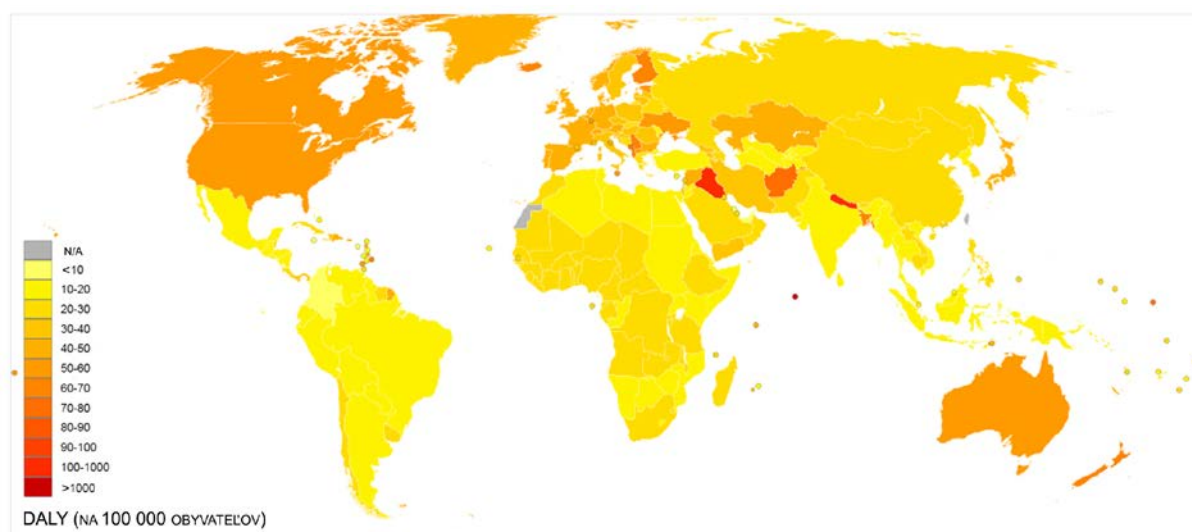
Od čias Jamesa Parkinsona sa epidemiologická situácia v súvislosti s PD významne zmenila. Ako bude neskôr diskutované, vek je najvýznamnejším rizikovým faktorom pre vznik tohto ochorenia. S narastajúcou priemernou dĺžkou života pribúdajú pacienti najmä vo vyšších vekových kategóriách.

### 1.1.1. Incidencia a prevalencia Parkinsonovej choroby

V roku 2016 bola publikovaná meta-analýza štúdií, venujúcich sa epidemiológii PD. Z tejto vyplýva, že priemerná incidencia PD bola u žien vo veku od 40 rokov 37,55/100 000/2016. U rovnako starých mužov bola priemerná incidencia 61,21/100 000/2016 (Hirsch *et al.*, 2016). Z týchto údajov je zrejmé, že PD postihuje viac mužov ako ženy, a to v pomere približne 1,6:1. Dôvodom môže byť protektívny efekt ženských pohlavných hormónov. Incidencia PD stúpa s vekom. U žien incidencia PD stúpala z hodnôt 3,26/100 000/2016 vo vekovej skupine 40-49 rokov až ku 103,48/100 000/2016 u žien, starších ako 80 rokov. V prípade mužov bol nárast ešte prudší, z hodnoty 3,57/100 000/2016 vo vekovej skupine 40-49 rokov až ku hodnote 258,47 u mužov vo veku nad 80 rokov. V desiatej dekáde života sa incidencia znižuje.

Prevalencia choroby sa v bežnej neselektovanej európskej populácii pohybuje v rozmedzí 1-2/1000 (von Campenhausen *et al.*, 2005). Vo vekovej skupine nad 60 rokov trpí PD asi 1% populácie (Lau a Breteler, 2006). V najvyšších vekových skupinách prevalencia stúpa až ku 4% (de Rijk *et al.* 2000). Zaujímavé je porovnanie prevalencie PD v rôznych častiach sveta (Obrázok 1.3). Zatiaľ čo v Číne bola prevalencia, zistená v tzv. „door-to-door“ prieskumoch, asi 15/100 000 (Wang, 1991), v Severnej Amerike a Európe sa incidencia PD pohybuje v rozmedzí 100-250/100 000 (Lai, 2001). Dôležitou, a zatiaľ nie úplne zodpovedanou otázkou je, či incidencia a prevalencia PD naozaj v čase stúpa, alebo je pozorovaný nárast týchto ukazovateľov spojený s fenoménom starnutia populácie. Viaceré štúdie však poukazujú na zvýšené riziko vzniku a vývoja PD, a to najmä v súvislosti s narastajúcou environmentálnou záťažou (Palacios, 2017). Viac ohrozenými týmito vplyvmi sa zdajú byť muži (Lee *et al.*, 2016, Savica *et al.*, 2016). Časové trendy je však pomerne zložitá hodnotiť, a to najmä z dôvodu variácií diagnostických kritérií, klasifikácií a použitých metodík v čase.

Dlhodobá je študovaná aj etnická a geografická korelácia PD. Je pomerne zložitá presne zistiť, aký vplyv majú uvedené faktory na riziko vzniku PD. Príkladom môže byť populácia Aškenázskych Židov, u ktorých je vysoká prevalencia geneticky podmienených foriem PD. Dôvodom je zrejme vysoká prevalencia nekompletne penetrujúcich génov asociovaných s PD. Ide napríklad o *LRRK2*, ktorý kóduje LRRK2 (*leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2*) kinázu a *GBA*, kódujúci glukocerebrozidázu (Orr-Urteger *et al.*, 2007, Sidransky *et al.*, 2009). Prevalencia PD je taktiež vysoká v populáciach Inuitov, pôvodných obyvateľov Aljašky a pôvodných obyvateľov Ameriky (Gordon *et al.*, 2012).



**Obrázok 1.3:** Svetová mapa Parkinsonovej choroby z pohľadu DALY hodnôt uvedených v správe WHO z roku 2004 "Global burden of disease: 2004 update". ("DALY - Disability Adjusted Life Years", roky života stratené pre zlý zdravotný stav). Prevzaté a upravené z <https://commons.wikimedia.org>.

### 1.1.2. Mortalita a prežívanie pacientov s Parkinsonovou chorobou

Existuje pomerne málo informácií o dopade samotnej diagnózy PD na úmrtnosť pacientov. Phillips a kol. zistili, že z celého nimi sledovaného súboru malo PD ako hlavnú príčinu smrti uvedených 37% pacientov (Phillips *et al.*, 1999). Iná štúdia sledovala zmeny mortality z dôvodu PD v USA počas 23 rokov v rokoch 1962-1984. U pacientov oboch pohlaví v strednom veku došlo v sledovanom období ku zníženiu mortality korelovanej s PD. Naopak v skupine geriatrických pacientov mala mortalita v dôsledku PD stúpajúcu tendenciu (Lilienfeld *et al.*, 1990). Okrem veku má na mortalitu u PD pacientov vplyv aj závažnosť motorických príznakov, avšak súvislosť medzi mortalitou, resp. prežívaním PD pacientov a závažnosťou dopamínerného deficitu dokázaná nebola (Lärvelä *et al.*, 2014, Santos-García *et al.*, 2018). Nedávna štúdia odhalila pozitívnu koreláciu medzi mortalitou u PD pacientov a ich socio-ekonomickým statusom (Beard *et al.*, 2017). Z uvedených údajov vyplýva, že na



celkovú a aj špecifickú mortalitu u PD pacientov má vplyv pomerne veľké množstvo faktorov, čo nepochybne súvisí s komplexnosťou samotného ochorenia.

### 1.1.3. Epidemiologická situácia na Slovensku

V roku 2015 bolo na Slovensku sledovaných 385,1 pacientov /100 000 obyvateľov. Novo hlásených prípadov bolo 68,6 pacientov /100 000 obyvateľov. V porovnaní s rokom 2014 kedy bolo sledovaných 400,6 pacientov /100 000 a novo hlásených 73,2 pacientov /100 000, došlo v týchto ukazovateľoch ku poklesu. Posledné údaje z roku 2016 naznačujú nárast počtu sledovaných pacientov na 412,2/100 000 a novo hlásených 83,7/100 000 (údaje zo správy Zdravotníctvo Slovenskej republiky v číslach 2015 a 2016, Národné centrum zdravotníckych informácií).

## 1.2. Etiopatogenéza Parkinsonovej choroby

Morfologickým podkladom klinických príznakov PD je najmä strata neurónov v určitých lokalitách *substantia nigra*, a to najmä vo ventrolaterálnej časti *pars compacta* (SNpc) (Fearnley a Lees, 1991), spojená s akumuláciou  $\alpha$ -synukleínu v bunkách viacerých oblastí mozgu. Zároveň treba dodať, že ani strata dopaminergných neurónov v *substantia nigra*, ani hromadenie  $\alpha$ -synukleínu nie je špecifické pre PD. Ich súčasný výskyt však slúži ako špecifický diagnostický znak idiopatickej formy PD (Dickson *et al.*, 2009). Strata neurónov SNpc je prítomná v širokom spektre parkinsonských ochorení, ktoré môžu byť ďalej na základe prítomnosti alebo neprítomnosti  $\alpha$ -synukleínu rozdelené na  $\alpha$ -synukleopatie a non- $\alpha$ -synukleopatie (Dickson *et al.*, 2009).

Najbežnejšími patológiami parkinsonského spektra, u ktorých nedochádza ku hromadeniu  $\alpha$ -synukleínu, sú predovšetkým tauopatie. Ide najmä o progresívnu supranukleárnu obrnu, kortikobazálnu degeneráciu, frontotemporálnu degeneráciu s parkinsonizmom spojenú s chromozómom 17 (FTDP-17), guamský komplex parkinsonizmus – demencia a *dementia pugilistica*, známa tiež ako boxerská demencia (Dickson *et al.*, 2009).

Syndrómy, do patogenézy ktorých nie je zapojený tau-proteín a  $\alpha$ -synukleín, sú skôr zriedkavé. Ide napríklad o frontotemporálnu lobárnu degeneráciu s inklúziami ubikvitínu.

V prípade tohto ochorenia dochádza ku hromadeniu TDP-43 ("TAR DNA binding protein of 43 kDa").

V prípade niektorých ochorení, spadajúcich do parkinsonského spektra, nie je možné presne identifikovať morfológický podklad patologického procesu. Prítomná býva glióza a nešpecifická strata neurónov. Ide najmä o geneticky podmienené formy, hoci aj v týchto prípadoch bola zaznamenaná akumulácia  $\alpha$ -synukleínu, či degenerácia *substantia nigra* (Farrer *et al.*, 2001, Hasegawa *et al.*, 2009).

Je dôležité zdôrazniť fakt, že v niektorých prípadoch, ktoré na prvý pohľad jednoznačne svedčia pre  $\alpha$ -synukleopatiu, napríklad PD, PD s demenciou, alebo demencia s Lewyho telieskami, je zároveň prítomný patologický proces, typický skôr pre patológiu Alzheimerického typu (senilné plaky, neurofibrilárne kľbká). V týchto prípadoch sa v rámci diagnostického procesu kladie dôraz najmä na dominujúci proces.

Atrofia na úrovni celého mozgu nepatrí medzi typické charakteristiky PD. Degenerácia postihuje len určité regióny v rámci mozgu, a to najmä už spomínanú *substantia nigra*. V úvodných fázach ochorenia je proces degenerácie lokalizovaný do ventrolaterálnej časti *substantia nigra*. S postupom ochorenia sú degeneráciou postihované aj ďalšie časti stredného mozgu (Damier *et al.*, 1999).

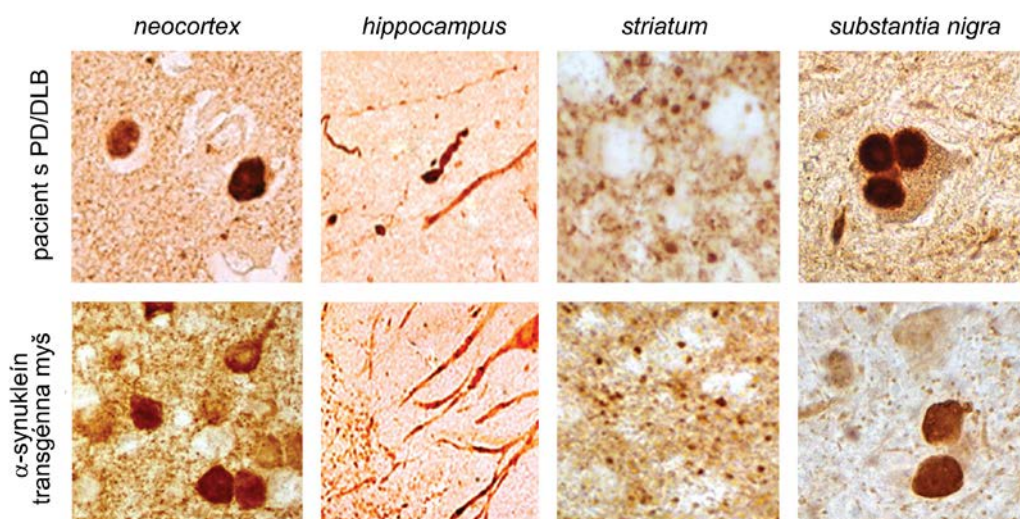
Pokiaľ dochádza popri degenerácii SNpc aj ku akumulácii  $\alpha$ -synukleínu, hromadí sa tento proteín v cytoplazme neurónov vo viacerých oblastiach mozgu, pričom dochádza ku infiltrácii jednotlivých oblastí vzostupne od mozgového kmeňa po neocortex. V mozgu s najmenším stupňom degenerácie je  $\alpha$ -synukleín akumulovaný v neurónoch predĺženej miechy, inklúzie sú prítomné v dorzálnych motorických jadrách IX. a X. hlavového nervu. Patologický proces je tak limitovaný na pás sivej hmoty tiahnucci sa od oblasti pod endymálnou výstelkou 4. komory po spodnú časť mozgového kmeňa. Prvým pozorovateľným znakom je objavenie sa tzv. Lewyho neuritov. S postupom patologického procesu sa objavujú Lewyho neurity a následne Lewyho telieska v kaudálnych rafeálnych jadrách a retikulárnej formácii. Takto popísali Braak *et al.* postup patologického procesu v 1. a 2. štádiu. Je dôležité poznamenať, že v týchto štádiách zatiaľ nedochádza ku postihnutiu sivej hmoty mezencephala, a teda ani *substantia nigra* (Braak *et al.*, 2003). V 3. a 4. štádiu postupne narastá miera poškodenia. V melanín-obsahujúcich neurónoch motorických jadier IX. a X. hlavového nervu sa začínajú objavovať Lewyho telieska. Hlavným znakom 3. štádia

je, že proces zasahuje aj melanínové neuróny *substantia nigra*. Makroskopicky je však proces depigmentácie *substantia nigra* v tomto štádiu nedetegovateľný. Aj v tejto oblasti sa ako prvé objavujú Lewyho neurity, nasledované Lewyho telieskami. Extranigrálne neuróny v rámci *tegmenta* mezencephala v 3. štádiu nevykazujú známky patológie spojenej s tvorbou inklúzií. Naopak, v iných oblastiach mezencephala sa začínajú objavovať Lewyho neurity. Ďalším typickým znakom 3. štádia je neprítomnosť patologického procesu v rámci štruktúr neokortexu (Braak *et al.*, 2003). V 4. štádiu dochádza ku masívnej strate pigmentovaných neurónov *substantia nigra*, a to najmä v *pars compacta*. V niektorých prípadoch je už v tomto štádiu prítomná makroskopicky viditeľná depigmentácia. Deštruktívny proces v tomto štádiu zasahuje aj ostatné časti mezencefala a ďalej sa šíri až na úroveň predného mozgu – do talamu a hypotalamu. Pre štvrté štádium je taktiež typické postihnutie *nucleus olfactorius anterior* a temporálneho mezokortexu (Braak *et al.*, 2003). Stupeň poškodenia vyššie popísaných štruktúr narastá v 5. a 6. štádiu. Najviac postihnuté časti *substantia nigra* strácajú pigmentáciu, pričom na mikroskopickej úrovni dochádza ku strate väčšiny pigmentovaných neurónov. Zároveň dochádza aj ku zníženiu množstva Lewyho neuritov a Lewyho teliesok, čo je sprevádzané nárastom množstva extraneuronálnych neuromelanínových agregátov. Okrem *substantia nigra* dochádza ku zjavnej strate pigmentovaných neurónov aj v jadrách IX. a X. hlavového nervu, retikulárnej formácii a komplexe *locus coeruleus - subcoeruleus*. V 5. štádiu dochádza ku zasiahnutiu oblastí neokortexu, pričom patologický proces sa šíri z temporálneho mezokortexu. Pre 6. štádium je typické postihnutie takmer celého neokortexu. Premotorická kôra, primárne motorické a senzorické oblasti sú však postihnuté len mierne (Braak *et al.*, 2003). Zjednodušené odstupňovanie („staging“) mozgovej patológie typickej pre idiopatickú (sporadickú) formu PD podľa Braaka *et al.* (2003) je zosumarizované v prílohe (Appendix 1.)

$\alpha$ -synukleín tvorí v perinukleárnom priestore neurónu okrúhle imunoreaktívne eozinofilné inklúzie, nazývané Lewyho telieska (Obrázok 1.4; Spillantini *et al.*, 1997). Tieto inklúzie môžu mať vzhľad denzných hyalínnych štruktúr. Štruktúry menej kompaktného vzhľadu tvoria tzv. kortikálne Lewyho telieska. Imunohistochemicky je možné v postihnutých neurónoch detegovať aj iné štruktúry, obsahujúce  $\alpha$ -synukleín. Ide predovšetkým o difúzne, granulárne, alebo pleomorfné inklúzie a inklúzie vo výbežkoch neurónov. Okrem už spomenutých lokalizácií, ako je *medulla oblongata*, mozgový kmeň, stredný mozog, predný mozog, či limbický systém, je možné nájsť inklúzie  $\alpha$ -synukleínu aj v bunkách periférneho autonómneho nervového systému. Medzi lokality mimo centrálného nervového systému, postihnuté Lewyho patológiou, patria najmä enterický plexus, paravertebrálne autonómne



gangliá a sympatkové nervové vlákna v nadobličkách a srdci a taktiež nervy kože (Fumimura *et al.*, 2007, Ikemura *et al.*, 2008, Orimo *et al.*, 2008). „Stagingový“ systém, navrhnutý skupinou Braak *et al.* predpokladá šírenie patologického procesu práve z týchto lokalizácií do mozgového kmeňa (Braak *et al.*, 2003).



**Obrázok 1.4:** Imunozačenením zobrazená akumulácia nerozpustného  $\alpha$ -synukleínu v telách a výbežkoch neurónov. Podobnosť  $\alpha$ -synukleínových patológií (Lewyho telieska, Lewyho neurity) v rôznych oblastiach mozgu pacientov (PD - Parkinsonova choroba, DLB - demencia s prítomnosťou Lewyho teliesok) a mozgu  $\alpha$ -Syn transgénnych myší slúžiacich ako model parkinsonizmu. Prevzaté a upravené z Volta *et al.*, 2015.

$\alpha$ -synukleín je prirodzene sa vyskytujúci proteín, pozostávajúci zo 140 aminokyselinových zvyškov. Za fyziologických okolností sa vyskytuje v cytosóle a zrejme aj v mitochondriách a jadre buniek. Jeho funkcia doposiaľ nie je plne objasnená. Predpokladá sa, že zohráva úlohu v procese kinetiky synaptických vezikúl, v aktivite mitochondrií, intracelulárnom „traffickingu“ a zrejme môže fungovať aj ako šaperón (Burre *et al.*, 2015). Vnútrobnková homeostáza  $\alpha$ -synukleínu je regulovaná aktivitou ubiquitín-proteazómového systému a systému lyzozomálnej autofágie (SLA). Predpokladá sa, že SLA hrá v procese degradácie  $\alpha$ -synukleínu dôležitejšiu úlohu ako proteazómový systém. Na procese degradácie  $\alpha$ -synukleínu sa zrejme podieľa ako šaperón-mediovaná autofágia, tak makroautofágia (Xilouri *et al.*, 2013). Inhibícia aktivity oboch systémov vedie ku akumulácii  $\alpha$ -synukleínu, pričom existujú dôkazy o vzájomnej regulácii týchto procesov (Xilouri *et al.*, 2009). Narušenie regulácie a funkcie uvedených degradačných systémov môže prispievať ku akumulácii  $\alpha$ -synukleínu. Starnutie – najvýznamnejší rizikový faktor PD – je spojené so znížením kapacity SLA a ubiquitín-proteázómového systému (Kaushik a Cuervo, 2015), čo je v súlade s nálezom zvyšovania množstva  $\alpha$ -synukleínu v dopaminergných neurónoch SNpc

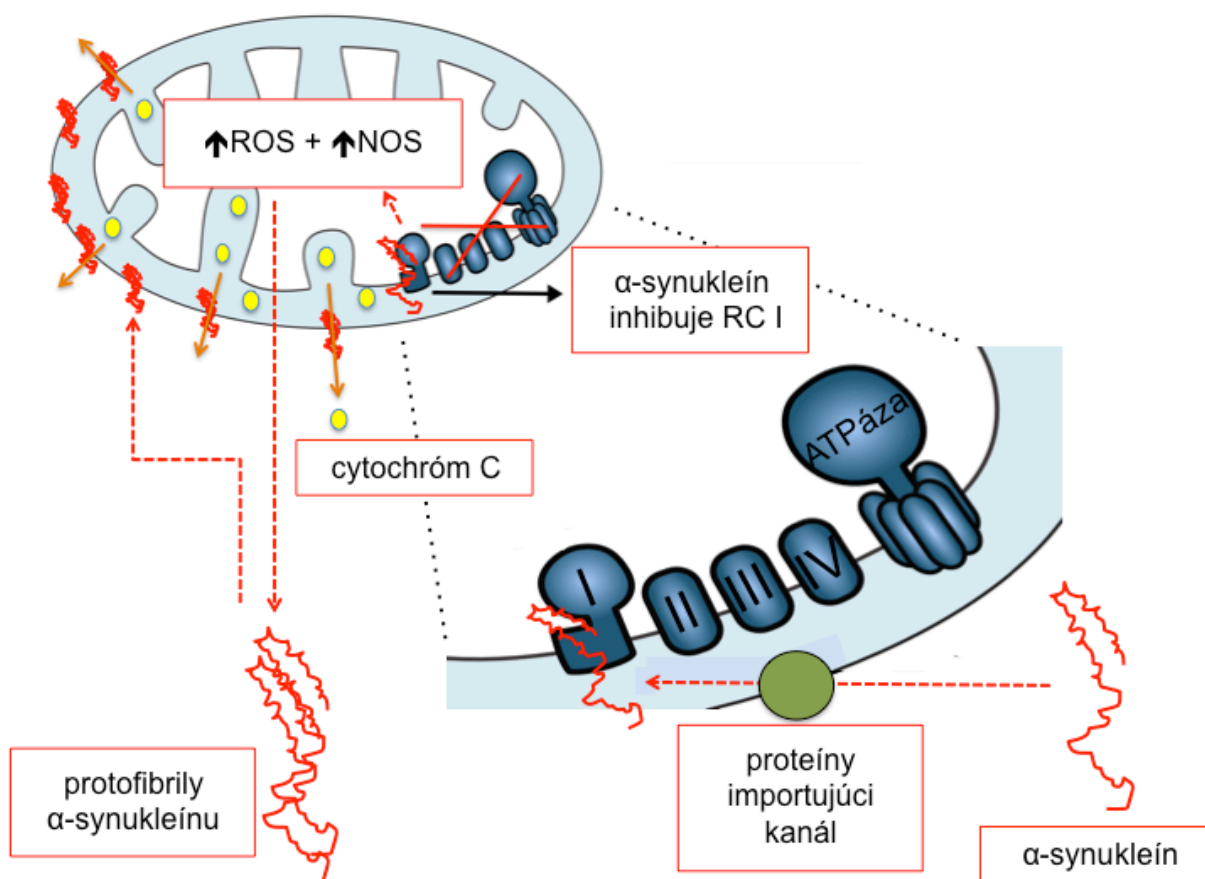
počas starnutia (Chu a Kordower, 2007). V oblasti SNpc pacientov a modelových organizmov bolo pozorované zníženie aktivity lyzozomálnych enzýmov, a to najmä v neurónoch obsahujúcich  $\alpha$ -synukleín (Chu *et al.*, 2009). Navyše dochádza aj ku zníženiu intenzity šaperón-mediovej autofágie a akumulácii autofagozómov (Anglade *et al.*, 1997). Oligoméry  $\alpha$ -synukleínu majú taktiež schopnosť inhibovať aktivitu ubiquitín-proteázomového systému a procesy makroautofágie (Emmanouilidou *et al.*, 2010, Winslow *et al.*, 2010). Z uvedených údajov je zrejmé, že u pacientov s PD dochádza k rozvoju bludného kruhu, kedy sa hromadí  $\alpha$ -synukleín v dôsledku dysfunkcie systému degradácie proteínov, pričom hromadiaci sa  $\alpha$ -synukleín ďalej alteruje tieto systémy.

### **1.2.1. Prionovému ochoreniu podobná propagácia $\alpha$ -synukleínu**

V poslednom období bol navrhnutý a čiastočne experimentálne podložený model šírenia  $\alpha$ -synukleínu, ktorý predpokladá šírenie  $\alpha$ -synukleínu, podobné priónovému ochoreniu. Podľa tohto modelu sú vytvorené agregáty  $\alpha$ -synukleínu presunuté intra-axonálnym transportom do iných oblastí mozgu a vylúčené do extracelulárneho priestoru.  $\alpha$ -synukleín je ďalej vychytávaný okolitými neurónmi, v ktorých zakladá ložiská akumulácie endogénneho  $\alpha$ -synukleínu (Angot *et al.*, 2010, Brundin *et al.*, 2010). Štúdiami na bunkových kultúrach bolo dokázané, že narušenie SLA vedie ku zvýšeniu vylučovania  $\alpha$ -synukleínu do extracelulárneho prostredia cestou exozómov. Do okolitých neurónov sa  $\alpha$ -synukleín dostáva cestou endocytózy (Tyson *et al.*, 2016). Z uvedeného vyplýva, že narušenie skladania  $\alpha$ -synukleínu v malom počte buniek môže potenciálne viesť ku šíreniu agregátov  $\alpha$ -synukleínu do iných regiónov nervového systému. Toto šírenie, a s tým spojený nástup klinickej symptomatiky, môže trvať aj niekoľko rokov od iniciálneho inzultu. Uvedený model je zároveň v súlade s teóriou, navrhnutou kolektívom Braak *et al.* Táto skupina demonštrovala šírenie patologického procesu z predĺženej miechy do vyšších etáží mozgu. Predpokladá sa, že samotný patologický proces, spojený s agregáciou  $\alpha$ -synukleínu, má pôvod v enterickom plexe gastrointestinálneho systému a v *bulbus olfactorius*, čo naznačujú aj prodromálne symptómy PD (anosmia, zápcha) (Berg *et al.*, 2015, Mhlknecht *et al.*, 2015). Z týchto lokalizácií sa zrejme patologický proces šíri práve spôsobom, podobným šíreniu priónových ochorení až do CNS, čo je sprevádzané nástupom motorických symptómov a príznakov, akonáhle dôjde k postihnutiu SN.

### 1.2.2. Mitochondriálna dysfunkcia

Porucha funkcie mitochondrií sa dnes považuje za jeden z najvýznamnejších etiopatogenetických faktorov v rozvoji PD. Aj v tomto prípade, podobne ako pri systéme degradácie proteínov, dochádza ku rozvoju bludného kruhu, kedy dysfunkcia mitochondrií, vyvolaná agregáciou  $\alpha$ -synukleínu, vedie ku ďalšiemu hromadeniu tohto proteínu a stále závažnejšiemu narušeniu mitochondriálnej homeostázy. Predpokladá sa, že v mitochondrii je prítomné malé množstvo  $\alpha$ -synukleínu aj za fyziologických podmienok, avšak hromadenie tohto proteínu v mitochondriách vedie ku inhibícii komplexu I koncového dýchacieho reťazca a ku zvýšenému oxidačnému stresu (Obrázok 1.5; Devi *et al.*, 2008). Ku narušeniu funkcie mitochondrií vedú aj mutácie niektorých parkinsonských génov, napríklad *LRRK2*, *PRKN* a *PINK1*. Tieto procesy však budú popísané v príslušnej kapitole (3).



**Obrázok 1.5: Úloha  $\alpha$ -synukleínu v rozvrate mitochondriálnej homeostázy.**  $\alpha$ -synukleín po naviazaní na komplex I dýchacieho reťazca (DR) môže spôsobiť znefunkčnenie DR; to vedie k zvýšeniu úrovne nitrozatívneho stresu, a to následne k agregácii  $\alpha$ -synukleínu. Protofibrily  $\alpha$ -synukleínu interagujú s vonkajšou mitochondriálnou membránou pričom ju permeabilizujú. To vedie k strate membránového potenciálu  $\Delta \Psi_m$  na vnútornej mitochondriálnej membráne a vyplaveniu cytochrómu C z mitochondrií. Následne dochádza ku aktivácii rodiny cytoplazmických kaspáz a indukcii apoptózy.

### 1.2.3. Oxidatívny stres

Dopaminergné neuróny *substantia nigra* sú obzvlášť náchylné na oxidatívny stres. Typickou morfológickou charakteristikou týchto neurónov sú mimoriadne dlhé, nemyelinizované axóny s veľkým množstvom synaptických spojení, ktorých správna funkcia znamená pre nervovú bunku veľkú spotrebu energie (Pissadaki *et al.*, 2013), a tým intenzívnejší metabolizmus, ktorý prirodzene vedie ku tvorbe voľných radikálov. Tieto neuróny zároveň vykazujú tzv. „pacemakerovú“ aktivitu, spojenú s osciláciami vnútrobunkovej koncentrácie vápnika ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a jeho energeticky náročnou extrúziou (Surmeier *et al.*, 2017). Samotná prítomnosť dopamínu a s ním súvisiace metabolické pochody môžu viesť ku zvýšenej hladine oxidačného stresu (Mosharov *et al.*, 2009). Mitochondriálna dysfunkcia v spojení s oxidatívnym stresom vedú ku zníženiu množstva a aktivity lyzozómov (Dehay *et al.*, 2010) ktoré, ako už bolo spomenuté, zohrávajú podstatnú úlohu v procesoch degradácie  $\alpha$ -synukleínu.

Z uvedených údajov je zrejmé, že procesy, iniciujúce a podporujúce procesy neurodegenerácie, nie sú izolované. Práve naopak, tieto deje sa navzájom prelínajú a v procese poškodenia neurónov pôsobia často synergicky, potencujúco.

### 1.2.4. Neuroinflamácia

Neuroinflamácia je sprievodným patofyziologickým dejom u viacerých patológií, spojených s nervovým systémom. Ide napríklad o depresívnu poruchu, Alzheimerovu chorobu, *sclerosis multiplex*, ale aj PD. Nepredpokladá sa, že by išlo priamo o vyvolávajúcu príčinu, napriek tomu zohráva neuroinflamácia v patogenéze PD významnú úlohu.

Výsledky experimentov na modeloch a aj na patientských vzorkách naznačujú možný vzťah medzi agregáciou  $\alpha$ -synukleínu a aktiváciou nešpecifickej a špecifickej imunitnej odpovede (Ransohoff, 2016). Neuroinflamácia ďalej narušuje proces skladania  $\alpha$ -synukleínu, čo vedie ku vytváraniu agregátov (Gao *et al.*, 2008). Na základe výsledkov experimentov na myšiach s nadexprimovaným génom *SNCA* sa predpokladá, že do procesu aktivácie mikrogliie, agregácie  $\alpha$ -synukleínu a rozvoja motorickej symptomatiky zasahuje črevný mikrobióm (Sampson *et al.*, 2016). Zápal sa nepodieľa len na procese deteriorácie nervového tkaniva. Mikrogliie sú schopné fagocytovať a degradovať agregáty extracelulárneho  $\alpha$ -synukleínu. V súčasnosti prebiehajú klinické štúdie, v rámci ktorých je študovaný

a posudzovaný účinok imunoterapie. Základným mechanizmom účinku týchto látok má byť odstraňovanie protilátkou-značených agregátov  $\alpha$ -synukleínu (George a Brundin, 2015).

### 1.2.5. Patofyziologické aspekty motorického deficitu

Bazálne gangliá patria do niekoľkých anatomicky a funkčne definovaných okruhov zahŕňajúcich okrem bazálnych ganglií aj kôrové centrá a talamus. Tieto okruhy sú zapojené najmä do mechanizmov kontroly cielených pohybov. Z morfológického hľadiska sú charakteristické konvergenciou veľkého počtu vstupných kortikálnych zapojení do subkortikálnych centier, z ktorých naopak vychádza relatívne malý počet zapojení. Toto usporiadanie naznačuje „filtročnú“ funkciu subkortikálnych motorických centier. Identifikované boli štyri okruhy, asociované s funkciou limbického systému, prefrontálneho kortexu a kontrolou okulomotorických a motorických funkcií, ktoré spájajú korešpondujúce frontálne kôrové oblasti s talamom a bazálnymi gangliami (Alexander *et al.*, 1990). Motorické prejavy parkinsonizmu sú výsledkom zníženej dopamínergnej transmisie v motorickej oblasti *striata*, čo vedie ku zvýšenej intenzite GABA-(“ $\gamma$ -aminobutyric acid”/kyselina  $\gamma$ -aminomaslová)-ergnej inhibície talamo-kortikálnych projekcií. Na základe týchto zistení v 90. rokoch minulého storočia prestala byť akinéza považovaná za “loss-of-function” symptóm. Naopak, ide o logický dôsledok zosilnenia inhibičnej aktivity bazálnych ganglií. Dôkazom je zmiernenie bradykinézy po ablácii *globus pallidus internus* alebo *nucleus subthalamicus* vo zvieracích modeloch a aj u pacientov s PD (Bergman *et al.*, 1990, Laitinen *et al.*, 1992). Tento model však nedokáže uspokojivo objasniť hyperkinetické prejavy, súvisiace napríklad s terapiou L-DOPA.

Predpokladá sa, že poruchy pohybov (hyper- aj hypokinetické) sú výsledkom komplexných porúch spracovania informácií. Parkinsonský „off-stav“ je charakteristický zvýšenou  $\beta$ -aktivitou (~20 Hz), zaznamenanou meraniami v bazálnych gangliách, ktorá je potlačiteľná dopaminergnou terapiou a hlbokou mozgovou stimuláciou, sprevádzanou zmiernením bradykinézy a rigidity (Huhn *et al.*, 2006 a 2008). Naopak, hyperkinéza je charakteristická  $\theta$ -aktivitou (4-7 Hz) (Chen *et al.*, 2006).

## 1.3. Klinický obraz a diagnostika Parkinsonovej choroby

Zlatým štandardom diagnostiky PD ostáva aj dnes klinické vyšetrenie pacienta špecialistom. Diagnostické kritériá stanovuje MDS (“Movement Disorder Society”).

V súčasnosti je v platnosti verzia z roku 2015 (Postuma *et al.*, 2015). Podľa týchto kritérií je diagnostika PD zameraná na identifikáciu motorického syndrómu (nigrálna symptomatika, Apendix 2). U mnohých pacientov sú však prítomné aj nemotorické príznaky (extranigrálna symptomatika, Apendix 2), ktoré môžu dokonca u niektorých pacientov dominovať klinickému obrazu. Samotný patologický proces sa začína v nedopamínerných štruktúrach centrálného a periférneho nervového systému, pričom práve v tejto fáze môžu prevládať spomínané nemotorické symptómy a príznaky. Z týchto dôvodov bola do diagnostického algoritmu zaradená jednotka „prodromálna PD“. Diagnostika PD prebieha podľa MDS kritérií v dvoch krokoch. Ako prvý je u pacienta identifikovaný parkinsonizmus a následne je vyhodnotené, či je možné parkinsonizmus u daného pacienta pripísať Parkinsonovej chorobe.

Základným predpokladom úspešnej diagnózy PD je klinické vyšetrenie pacienta špecialistom. Absolútne stopercentná diagnóza PD sa však za života pacienta stanoviť nedá. Asi u 75%-95% pacientov, ktorým bola špecialistom stanovená diagnóza PD, je PD potvrdená aj *post mortem* (Rajput *et al.*, 1991, Hughes *et al.*, 1992, Litvan *et al.*, 1998). Ku nepresnej diagnóze PD vedie najmä nerozpoznanie iných patologických stavov, vedúcich ku neurodegenerácii a sekundárnemu parkinsonizmu. Ide napríklad o systémové atrofie, progresívnu supranukleárnu obrnu, vaskulárny parkinsonizmus a iné.

Ako už bolo spomenuté, prvým krokom ku správnej diagnóze PD je identifikácia parkinsonizmu. Tento stav je charakterizovaný bradykinézou, spojenou s pokojovým tremorom alebo rigiditou, prípadne obidvomi príznakmi naraz.

Bradykinéza je definovaná ako pomalé pohyby spojené s poklesom amplitúdy a rýchlosti pohybov pri pokračujúcej činnosti. Bradykinéza môže byť odhalená rôznymi vyšetreniami, napríklad supinačno-pronačným pohybom rúk a opakovaným dotykom palca a ukazováka (“finger tapping”). Pre diagnostiku PD je nevyhnutné zadokumentovať fenomén bradykinézy na končatinách, hoci je pozorovateľný aj pri reči a mimike tváre. Pre PD je charakteristická rigidita typu olovenej rúrky, kedy je prítomná rezistencia proti pasívnemu pohybu v celom rozsahu pohybu nezávisle na rýchlosti. U pacientov s PD môže byť prítomná aj rigidita typu ozubeného kolesa, avšak izolovaný nález tohto typu rigidity je nepostačujúci pre diagnostický proces v rámci diagnostiky PD. Pokojový tremor je charakterizovaný frekvenciou pohybov 4-6 Hz na nečinnnej končatine a čiastočným útlmom pri začatí pohybu.

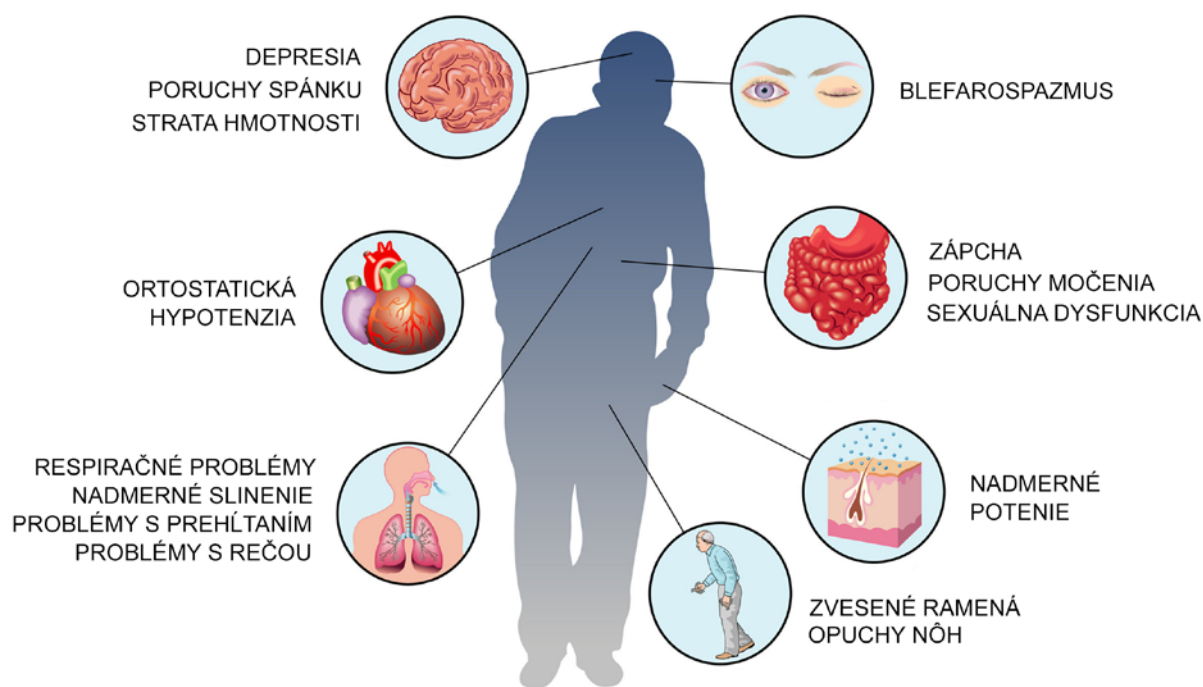
Ku uvedeným kritériám sa niekedy radí aj posturálna instabilita, hoci táto nie je súčasťou MDS-PD kritérií.

Ďalším krokom je u pacienta s parkinsonizmom zistiť, či je tento stav vyvolaný PD. Pre stanovenie klinickej diagnózy je nevyhnutné, aby boli splnené tri kritériá:

1. absencia absolútnych exklúzných kritérií,
2. prítomnosť aspoň dvoch podporných kritérií,
3. neprítomnosť tzv “red flags“, ktoré definujú fulminantný priebeh niektorých symptómov a príznakov.

Tieto kritériá sú súčasťou MDS diagnostického algoritmu (Postuma *et al.*, 2015). Na sledovanie progresie motorického postihnutia pacientov slúži UPDRS (“Unified Parkinson’s Disease Rating Scale“) (Goetz *et al.*, 2008).

Medzi najvýznamnejšie nemotorické poruchy (Obrázok 1.6) patrí najmä narušenie regulácie spánkového cyklu, kognitívne poruchy (poruchy vybavovania pamäťovej stopy, demencia), poruchy nálady a afektu, autonómne dysfunkcie (ortostatická hypotenzia, urogenitálna dysfunkcia, obstipácia) a senzorické symptómy (najmä hyposmia) (Chaudhuri a Schapira, 2009). Niektoré sa môžu objaviť roky až desaťročia pred nástupom motorických príznakov.



**Obrázok 1.6: Nemotorické ťažkosti spôsobené Parkinsonovou chorobou.** Prevzaté a upravené z Kentucky Neurology and Rehab ([www.kentuckyneurologyandrehab.com](http://www.kentuckyneurologyandrehab.com)).

Motorické, neuropsychiatrické a autonómne a senzitivné komplikácie súvisiace s PD, alebo liečbou ochorenia sú zosumarizované v prílohe (Apendix 3.)

## 1.4. Zobrazovacie a laboratórne metódy v diagnostike Parkinsonovej choroby

Éra zobrazovacích techník relevantných pre PD, sa začala použitím  $^{18}\text{F}$  značenej molekuly L-DOPA a PET (pozitrónová emisná tomografia) skenu v 80. rokoch minulého storočia (Garnet *et al.*, 1983). Odvtedy umožnili pokroky v oblasti neuroimagingových techník výrazne napomôcť najmä ku diferenciálnej diagnostike PD. Medzi takéto techniky patrí napríklad MRI (zobrazenie magnetickou rezonanciou) a jeho rôzne variácie (difúzne vážené meranie, volumetria, multimodálne zobrazenie). Tieto umožňujú odhaliť a identifikovať iné potenciálne príčiny parkinsonizmu.

Početné štúdie odhalili zmeny v koncentrácii viacerých proteínov v cerebrospinálnom moku. Išlo najmä o rôzne varianty  $\alpha$ -synukleínu. Senzitivita a špecifita týchto vyšetrení je však príliš nízka na to, aby mohli byť tieto parametre používané v rutinej diagnostike PD. Situácia je podobná aj v prípade plazmatických, resp. sérových biomarkerov. Napriek tomu boli popísané korelácie medzi koncentráciami niektorých látok a progresiou ochorenia. Ako



príklad možno uviesť apolipoproteín A1, ktorého plazmatická koncentrácia negatívne koreluje so závažnosťou motorických symptómov pacientov (Swanson *et al.*, 2015).

Ako už bolo spomenuté v predošlom texte, nemotorické príznaky sa môžu objavovať pomerne dlhý čas pred nástupom motorickej symptomatiky. Niektoré z týchto včasných porúch je možné diagnostikovať a na základe týchto výsledkov manažovať pacienta ešte v skorých štádiách ochorenia. Medzi takéto poruchy patrí napríklad idiopatická REM spánková porucha, ktorej prítomnosť v klinickom obraze znamená pre pacienta vysoké riziko rozvoja PD a iných  $\alpha$ -synukleínopatií (Högl *et al.*, 2018). Ďalšími príznakmi, dlho predchádzajúcimi motorické príznaky, sú hyposmia a hypogeusia. Ide o pomerne ľahko a finančne nenáročne diagnostikovateľné poruchy (Tarakad a Jankovic, 2017). V praxi je častejšie používané vyšetrenie čuchu. Hyposmia je však pomerne častá v bežnej populácii, a preto má relatívne nízku špecificitu.

## **1.5. Terapeutické možnosti v manažmente Parkinsonovej choroby**

V posledných desaťročiach nastal významný posun v možnostiach terapeutického ovplyvnenia symptomatiky PD. Najväčším prelomom však naďalej ostáva zavedenie prekursora dopamínu, L-DOPA, ktorým je nahradzaný deficit dopamínu, spôsobený stratou striatálnych dopamínerných neurónov.

Terapia L-DOPA je aj dnes zlatým štandardom v terapii PD a aj iných foriem parkinsonizmu. Užívanie L-DOPA je však sprevádzané viacerými motorickými komplikáciami, najmä liekovo-navodenou dyskinézou. Mechanizmy vedúce ku rozvoju L-DOPA-indukovanej dyskinézy neboli doposiaľ plne objasnené. Predpokladá sa zapojenie pre- a postsynaptických mechanizmov a nefyziologickej pulznej stimulácie dopamínového receptora, čo vedie k neprimeraným odpovediam (Cenci *et al.*, 2014, Piconi *et al.*, 2017). Jednou z príčin rozvoja dyskinézy je zrejme aj krátky biologický polčas L-DOPA a fluktuácie v absorpcii v gastrointestinálnom trakte a prestupe cez hematoencefalickú bariéru. Čiastočným riešením tohto problému sú nové liekové formy s postupným a/alebo kontrolovaným uvoľňovaním (Poewe a Antonini, 2015).

Súčasný preparáty obsahujú okrem L-DOPA aj inhibítory dekarboxylázy aromatických aminokyselín, čo zvyšuje biodostupnosť liečiva. Následkom toho je však aktivovaná alternatívna metabolická dráha zahŕňajúca ortho-metyláciu L-DOPA prostredníctvom

katechol-O-metyltransferázy (COMT). Inhibícia aktivity tohto enzýmu ďalej zvyšuje biodostupnosť L-DOPA. Z použitia inhibítorov COMT profitujú najmä pacienti, u ktorých došlo ku rozvoju „wearing-off“ typu motorických príznakov (Muller, 2015).

Veľmi efektívnym doplnkom ku terapii L-DOPA sú látky zo skupiny inhibítorov monoaminoxidázy B (MAOB). Enzým MAOB je popri opätovnom vychytaní dopamínu hlavným mechanizmom zabezpečujúcim elimináciu dopamínu zo synaptickej štrbiny. Inhibícia MAOB zvyšuje koncentráciu dopamínu v synaptickej štrbine, a tým aj jeho dostupnosť. V súčasnosti je okrem ireverzibilných MAOB inhibítorov selegilínu a rasagilínu dostupný aj reverzibilný MAOB inhibítor safinamid (Schapira *et al.*, 2017).

Veľmi podstatnou skupinou používanou v rámci farmakoterapie PD sú dopaminergní agonisti. Prvým zástupcom tejto skupiny, ktorý bol úspešne zavedený do klinickej praxe, je bromokriptín. V súčasnosti je dostupných viacero preparátov, ktoré sú pevnou súčasťou farmakoterapeutického algoritmu manažmentu PD. V porovnaní s L-DOPA majú tieto látky dlhší biologický polčas. Z ich použitia profitujú najmä pacienti, ktorí trpia nežiadúcimi motorickými príznakmi dôsledkom užívania L-DOPA. Nevýhodou je naopak slabší účinok v porovnaní s L-DOPA. Významné postavenie medzi týmito látkami má apomorfín, ktorý pôsobí na D1 aj D2 dopaminergné receptory a jeho účinok je dokonca silnejší v porovnaní s L-DOPA (Frankel *et al.*, 1990). Kontinuálna subkutánna aplikácia navyše vedie aj ku redukcii L-DOPA indukovanej dyskinézy (Katzenschlager *et al.*, 2005). V súčasnosti sú vyvíjané liekové formy apomorfínu určené na sublingválne použitie (Hauser *et al.*, 2016).

Za zmienku stoja aj nové PD terapeutické schémy vyvíjané na báze špecifických protilátok proti  $\alpha$ -synukleínu, kde sa ale ako najväčší problém javí stabilita protilátok a tým limitovaná doba ich účinku. S riešením tohoto problému prišla skupina okolo Dr. Knowlesa a Dr. Hollanda, ktorá publikovala nanotechnológiu výroby hodvábných mikrokokónov ako ochranných a stabilizačných kapsúl pre senzitivne „cargo“, akým su napríklad práve protilátky ale aj iné proteíny (Shimanowich *et al.*, 2017).

### **1.5.1. Hlboká mozgová stimulácia**

Hlboká mozgová stimulácia (HMS) začala ako terapeutická modalita naberať na význame v 90. rokoch minulého storočia, kedy bola identifikovaná štruktúra *nucleus*

*subthalamicus* ako potenciálny cieľ pre HMS (Limousin *et al.*, 1995). Metóda HMS je založená na fakte, že vysokofrekvenčná elektrická stimulácia (100-200 Hz) cieľových oblastí mozgu má rovnaký funkčný výstup ako lézia tejto oblasti. Použitím metódy HMS je teda možné vyhnúť sa deštrukcii nervového tkaniva za účelom zlepšenia symptomatiky. Úspešnosť tejto terapie je naviazaná na responsibilitu pacienta na L-DOPA terapiu. Pacienti, ktorí nereagujú na L-DOPA, pravdepodobne nebudú benefitovať ani z použitia HMS. Ideálnym kandidátom na použitie HMS je pacient s idiopatickou formou PD a výbornou reakciou na L-DOPA, u ktorého sa rozvinuli motorické komplikácie ako výsledok dlhodobej terapie (Bronstein *et al.*, 2011). Ďalšou cieľovou štruktúrou HMS je *globus pallidus internus*, avšak v tomto prípade zvyčajne nie je možné redukovať farmakoterapiu (Odekerken *et al.*, 2013).

## 2. Genetika Parkinsonovej choroby

Prvé nespochybniteľné dôkazy o tom, že PD môže byť podmienená aj geneticky, teda dedičná, boli publikované v roku 1996 (Polymeropoulos *et al.*, 1996, 1997). V krátkom čase pribudli dôkazy, že PD je komplexným ochorením s heterogénnym genetickým pozadím, ktoré dokáže vysvetliť vznik PD, ale len v nízkom percente všetkých zachytených prípadov (Scott *et al.*, 1999).

Po takmer dvoch dekádach od týchto objavov sa bezvýhradne potvrdila genetická heterogenita v pozadí vzniku PD, čoho dôkazom je fakt, že dnes poznáme až 20 chromozomálnych lokusov, ktoré boli asociované so vznikom PD (tzv. *PARK* lokusy). Avšak je nutné povedať, že len šesť z týchto lokusov obsahuje gény, ktorých mutácie vedú s určitou k monogénnej forme PD, teda forme kedy mutácia jediného genu stačí k nástupu a rozvoju ochorenia. Celkovo z hľadiska epidemiológie dokážu mutácie v génoch spôsobujúcich monogénnu formu PD vysvetliť vznik len približne 3% – 5% všetkých prípadov sporadickej PD. Z toho jasne vyplýva, že PD je multifaktoriálne podmienené ochorenie, za ktorého vznikom je nutné hľadať súhrn genetických, epigenetických a environmentálnych faktorov a ich vplyv na vyvíjajúci sa a starnúci mozog.

### 2.1. Genetická klasifikácia Parkinsonovej choroby

Súčasná genetická nomenklatúra PD zahŕňa 20 chromozómových lokusov, pričom tieto sú označené “*PARK*” a číslom, ktoré reflektuje poradie, v akom boli popísané (Tabuľka 2.1). Je potrebné zdôrazniť, že táto nomenklatúra je stále nedokonalá a obsahuje niekoľko nezrovnalostí. Napríklad táto nomenklatúra obsahuje tak potvrdené, ako aj nepotvrdené PD-asociované lokusy. Zároveň pre niektoré z *PARK* lokusov dodnes nepoznáme konkrétny kauzálny gén súvisiaci so vznikom PD, poprípade nepoznáme v niektorých kauzálnych génoch PD-asociované (chorobu definujúce) mutácie (niektoré aleloformy týchto génov, poprípade zmeny v ich expresii, sú považované za rizikový faktor vzniku PD).

**Tabuľka 2.1: Lokusy asociované s Parkinsonovou chorobou**

Lokus	Chromozómová lokalizácia	Ochorenie	Dedičnosť	Gén	Potvrdený (K) Nepotvrdený (NK)	Metóda identifikácie
<i>PARK1</i>	4q21-22	EOPD	AD	<i>SNCA</i>	K	LA
<i>PARK2</i>	6q25.2 – q27	EOPD	AR	<i>Parkin</i>	K	LA
<i>PARK3</i>	2p13	CPD	AD	<i>Neznámy</i>	NK	LA
<i>PARK4</i>	4q21 – q23	EOPD	AD	<i>SNCA</i>	Identický s <i>PARK1</i>	LA
<i>PARK5</i>	4p13	CPD	AD	<i>UCHL1</i>	NK	FCGA
<i>PARK6</i>	1p35 – p36	EOPD	AR	<i>PINK-1</i>	K	LA
<i>PARK7</i>	1p36	EOPD	AR	<i>DJ-1</i>	K	LA
<i>PARK8</i>	12q12	CPD	AD	<i>LRRK2</i>	K	LA
<i>PARK9</i>	1p36	KRS	AR	<i>ATP13A2</i>	K	LA
<i>PARK10</i>	1p32	CPD	RF	<i>Neznámy</i>	K	LA
<i>PARK11</i>	2q36-27	LOPD	AD	<i>Neznámy</i>	NK	LA
<i>PARK12</i>	Xq21 – q25	CPD	RF	<i>Neznámy</i>	K	LA
<i>PARK13</i>	2p12	CPD	AD/RF	<i>HTRA2</i>	NK	CGA
<i>PARK14</i>	22q13.1	EO-D-PD	AR	<i>PLA2G6</i>	K	LA
<i>PARK15</i>	22q12 – q13	EO-PPS	AR	<i>FBX07</i>	K	LA
<i>PARK16</i>	1q32	CPD	RF	<i>SLC41A1</i> <i>RAB7L1</i>	K	GWAS
<i>PARK17</i>	16q11.2	CPD	AD	<i>VPS35</i>	K	ES
<i>PARK18</i>	3q27.1	CPD	AD	<i>EIF4G1</i>	NK	LA

Skratky: AD (autozomálne dominantný); AR (autozomálne recesívny); CGA (“candidate gene approach”); CPD (klasická Parkinsonova choroba); EO-D-PD (skorý nástup dystónie a Parkinsonovej choroby); EOPD (skorý nástup Parkinsonovej choroby); EO-PPS (skorý nástup parkinsonského pyramidálneho syndrómu); ES (exómové sekvenovanie); GWAS (“genome wide association study”); K (konfirmovaný); KRS (Kufor-Rakebov syndróm; atypická Parkinsonova choroba s demenciou, spasticitou, a supranukleárnou paralýzou pohľadu); LA (“linkage analysis” väzbová analýza), LOPD (neskorý nástup Parkinsonovej choroby); NK (nekonfirmovaný), RF (rizikový faktor). Tabuľka bola prebraná a modifikovaná z Klein a Westenberger (2012).

### 2.1.1. Genetické princípy a výnimky z genetických princípov v Parkinsonovej chorobe

Väčšina prípadov PD sú sporadické formy bez zjavnej rodinnej histórie. Len menej ako 10% prípadov má jasne definovanú rodinnú etiológiu (Thomas a Beal., 2007). Spomedzi mutácií v šiestich génoch, ktoré boli preukázateľne spojené so vznikom monogénne-podmienenej familiárnej formy PD, tie v *SNCA* (*PARK1/4*; gén kódujúci  $\alpha$ -synukleín) a *LRRK2* (*PARK8*; gén kódujúci kinázu “leucine rich repeat kinase 2” podmieňujú vznik familiárnej PD s autozomálne-dominantným (AD) typom dedičnosti. Mutácie v ostatných štyroch génoch (*Parkin* (*PARK2*; gén kódujúci E3 ubikvitín ligázu), *PINK1* (*PARK6*; gén kódujúci kinázu “PTEN induced putative kinase 1”), *DJ-1* (*PARK7*; gén kódujúci multifaktoriálny protein/enzým “protein deglycase DJ-1), a *ATP13A2* (*PARK9*; gén kódujúci ATPázu typ 13A2/Kufor-Rakeb ATPázu P5) podmieňujú vznik autozomálne recesívnej (AR) formy PD (Williams *et al.*, 2005, Klein a Westenberger, 2012, Richarme *et al.*, 2015, De Lazzari a Bisaglia, 2017, Aguirre *et al.*, 2018).

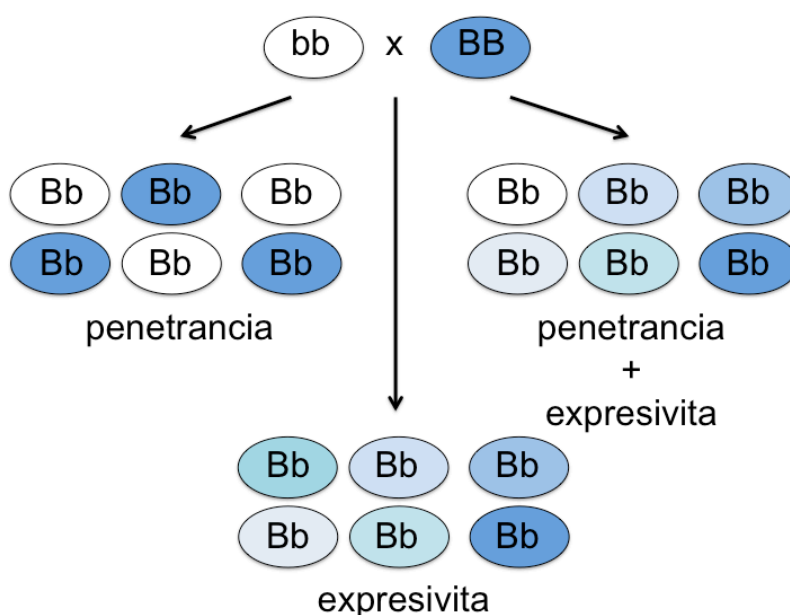
Všetky z doteraz dobre a jasne popísaných dedičných foriem PD sú autozomálne, to znamená, že mutantný variant génu podmieňujúci vznik PD sa nachádza na niektorom z autozómov, hoci, nie tak dávno boli popísané aj na X-chromozóm viazané formy dedičnosti PD (2.1.2.3. a 2.1.2.4). Tu je však potrebné zdôrazniť, že je potrebný ďalší výskum X-chromozomálnej dedičnosti PD na to, aby sa dostala na úroveň všeobecnej akceptovateľnosti tak ako je tomu dnes u autozomálnych foriem PD. Autozomálne dominantná forma dedičnosti predpokladá, že v našom prípade PD-asociovaná, mutovaná alela génu *SNCA* alebo *LRRK2* spôsobí vznik PD, pričom nie je potrebné, aby sa takáto alela nachádzala aj v druhej chromozómovej sade. Naopak, AR forma familiárnej PD je podmienená prítomnosťou mutovanej alely niektorého z horeuvedených génov v oboch chromozómových sadách. Teda, v prípade AD dedičnosti ak je jeden z rodičov homozygotom nesúcim dve kopie danej PD-asociovanej alely, pričom druhý rodič je zdravý (nesie obe alely divého typu), budú všetci potomkovia v určitej fáze svojho života postihnutí PD. V prípade, že jeden z rodičov je zdravý a druhý rodič je heterozygotom pre danú PD-asociovanú dominantnú alelu, potom je riziko vzniku PD u každého z potomkov takéhoto páru 50%. Pri pohľade na rodokmeň rodiny s AD formou PD (Vid'. 2.1.2.) je zjavné, že každý PD pacient mal minimálne jedného z rodičov, ktorý bol tiež postihnutý PD. Z viacgeneračných rodokmeňov je tiež jasné, že PD zapríčinená dominantnou úplne penetrantnou alelou nepreskakuje generácie, z čoho vyplýva, že v konkrétnej rodine sa v každej generácii vyskytol minimálne jeden člen postihnutý PD. Pri

AR forme dedičnosti PD je fenotypický prejav PD-asociovej mutantnej alely potlačený dominanciou alely divého typu. Na to, aby sa u človeka prejavila AR forma PD je potrebná prítomnosť konkrétnej PD-asociovej alely v dvoch kópiách. V prípade, že jeden z rodičov je homozygotom nesúcim dve kópie recesívnej PD-asociovej alely daného génu a druhý rodič je zdravým homozygotom, nesúcim dve alely divého typu pre ten istý gén, potom žiadne z detí nebude v priebehu života postihnuté recesívne dedičnou formou PD, avšak všetky takéto deti budú heterozygoti s 50% potenciálom prenosu PD-asociovej alely do ďalšej generácie (Vid'. 2.1.2.). V prípade, že obaja rodičia sú heterozygoti pre danú PD-asociovanú alelu s recesívnym typom dedičnosti, je pravdepodobné, že 25% potomkov takéhoto páru budú tvoriť zdraví jedinci nesúci dve kópie divej alely daného PD-asociovaného génu, 50% ich potomkov budú zdraví heterozygotní jedinci schopní preniesť mutantnú alelu do ďalšej generácie a 25% budú tvoriť potomkovia homozygotní pre danú mutantnú alelu, pričom u týchto sa v priebehu života vyvinie PD (vid' 2.1.2.).

Na mieste je otázka, ako môže mutantná alela pôsobiť dominantne vo vzťahu k alele divého typu? Možné sú nasledujúce scenáre: (1) Haploinsuficiencia, to jest stav, kedy jedna kópia alely divého typu nedokáže zabezpečiť dostatočné množstvo proteínu na zabezpečenie funkcie, ktorú vykonáva; (2) Funkčný dominantne-negatívny efekt, teda mutovaný peptid (produkt mutantnej alely) negatívne interaguje s funkciou divej alely. Ako príklad môže poslúžiť stav, kedy peptid vytvára multimerické funkčné komplexy. Teda ak "chimerický" komplex pozostávajúci z normálnych podjednotiek (divý typ) a mutantných (funkčne deviovaných) podjednotiek potom takýto proteínový komplex nemôže plniť svoju funkciu, či už z kvalitatívneho a/alebo kvantitatívneho hľadiska; (3) Mutantná alela nesie tzv. "gain of function" mutáciu. V tomto scenári mutantná alela kóduje peptid, ktorý nesie kvalitatívne novú, abnormálnu funkciu, ktorá vedie k patologickému fenotypu (Klein a Westenberger, 2012). Je však nutné zdôrazniť, že aj pomnoženie (multiplikácia) alely divého typu, poprípade nadexpresia génu spôsobená extragénovou mutáciou v oblasti regulačných sekvencií konkrétneho génu (divej alely), môže byť považovaná za "gain of function" mutáciu (zmenu) (Fereze *et al.*, 2015).

Pri pohľade na rodokmene s geneticky konzervovanou PD nie je spôsob Mendelovskej dedičnosti vždy jasne čitateľný. Genealogickú analýzu často komplikuje stupeň penetrancie a expresivity danej PD-asociovej mutantnej alely. Definíciu a rozdiel medzi penetranciou a expresivitou najlepšie vystihuje príklad uvedený na obrázku (2.1). Penetrancia alely X daného génu je definovaná podielom jedincov nesúcich túto alelu v populácii, ku podielu jedincov v

tej istej populácii majúcih jasne definovaný fenotyp súvisiaci s expresiou alely X. Na rozdiel od penetrancie, expresivita danej alely X definuje kvantitatívne odstupňovanie fenotypického prejavu tejto alely v príslušnej definovanej populácii. Ako v prípade penetrancie tak aj expresivity sú významnými premenými nielen genetický komponent, ale aj epigenetické a enviromentálne modulátory konkrétneho fenotypického prejavu. S vplyvom prostredia priamo súvisí variabilita vnesená do rodinnej genealógie prostredníctvom fenokópií. Fenokópiu definujeme ako fenotypický prejav spôsobený vplyvom okolitého prostredia bez vplyvu genetického komponentu alely X, ktorý je identický (alebo takmer identický) s fenotypom vyplývajúcim z pôsobenia/expresie alely X.



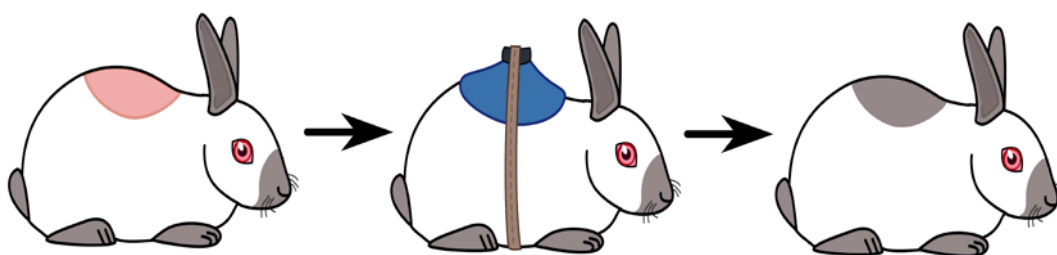
**Obrázok 2.1: Penetrancia versus expresivita.** Sfarbenie vajec už vyhynutého havajského endemitického vtáka Oo' Aa (*Moho braccatus*) je kontrolované lokusom *BLU*, pričom alela B je dominantná k alele b. Ako súčasť stratégie záchrany boli vtáky znášajúce modré vajcia s genotypom BB z jedného ostrova krížené s vtákmi znášajúcimi biele vajcia z iného ostrova s genotypom bb. Keďže v F1 generácii boli všetky vtáky heterozygoti Bb, dalo by sa očakávať, že aj tieto znášali modré vajcia tak ako homozygoti BB. Avšak varírujúca penetrancia a expresivita viedla k trom variabilným paternom dedičnosti odlišných od očakávaného. Modifikované z [https://www.mun.ca/biology/scarr/Penetrance\\_vs\\_Expressivity.html](https://www.mun.ca/biology/scarr/Penetrance_vs_Expressivity.html)

- A) Ak varíruje **penetrancia**, dominancia alely B v genotype Bb nie je niekedy reflektovaná v korešpondujúcom fenotype: niektoré Bb vajcia sú modré, rovnako ako tie od ich rodičov BB, iné sú biele ako tie od ich bb rodičov napriek prítomnosti alely B. "Nedostatočná" penetrancia môže vysvetliť, prečo u niektorých jedincov fenotyp pre daný znak neodráža príslušný genotyp. Neúplná penetrancia môže teda z pohľadu fenotypu vysvetliť zdanlivé preskakovanie generácií v dedičnosti dominantnej alely B pri genealogickej analýze. Je preto nutné mať na mysli, predovšetkým pri genealogickej analýze chorôb s autozomálne dominantným spôsobom dedičnosti, že neúplná penetrancia dominantnej alely X môže viesť k chybnjej interpretácii typu dedičnosti (namiesto autozomálne dominantného interpretovaného ako autozomálne recesívny).
- B) Ak varíruje **expresivita**, genotyp Bb nebude vo fenotype vyjadrený rovnako, to znamená, že všetky vajcia budú síce modré, ale odtieň modrej na jednotlivých vajciach sa bude líšiť. Variabilná expresivita je pripisovaná pôsobeniu environmentálnych faktorov, alebo zmenám v iných lokusoch genómu. Fenotypická variabilita spôsobená varírujúcou expresivitou taktiež výrazne komplikuje genealogické analýzy v prípade mnohých dedičných ochorení.



- C) Ak varíruje **expresivita aj penetrácia**, v F1 generácii môžeme nájsť vajcia od bielych cez paletu bledších odtieňov modrej až po modré aj napriek tomu, že všetky sú heterozygotné, Bb. Za povšimnutie stojí, že nedostatočná penetrancia alely B môže byť považovaná aj za extrémnu formu jej expresivity v prípade, že škála jej expresivity zahŕňa aj jej neexprimovanie.

Rasa kráľika (*Oryctolagus sp.*), králik himalájsky, môže poslúžiť ako excelentný príklad fenokópie. Himalájsky králik má pri normálnych teplotách biele sfarbenie s čierne sfarbenými extremitami ako sú: uši, nos, chvost a končatiny od kolien a lakt'ov smerom k akrám (Obrázok 2.2). Pri normálnej teplote je himalájsky králik fenokópiou kráľika kalifornského. Čierne sfarbené extremity himalájskeho kráľika majú teplotu len okolo 34 °C, teda nižšiu ako je zvyšok tela. V prípade, že čierne sfarbené extremity experimentálne vystavíme vyšším teplotám, bude nová srst' sfarbená na bielo. Naopak, ak časť bielo sfarbenej srsti vystavíme pôsobeniu nižších teplôt, nová srst' bude čierne-pigmentovaná. Za tieto zmeny fenotypu závislé od prostredia je zodpovedná recesívna alela  $c^h$ , ktorá v homozygotnom stave podmieňuje zmeny sfarbenia srsti závislé od teploty u himalájskeho kráľika. Alela  $c^h$  kóduje teplotne senzitívny enzým (inaktivovaný teplotou nad 34 °C) zodpovedný za syntézu čierneho pigmentu (<http://www.biologydiscussion.com/genetics/role-of-environment-and-genes-genetics/67392>). V chovoch v chladných klimatických podmienkach sú himalájske kráľiky úplne čierne a sú teda fenokópiou kráľikov s geneticky podmieneným sfarbením srsti typ "agouty" (šedočierna). Naopak, v chovoch v teplých klimatických pásmach sú himalájske kráľiky úplne biele a sú teda fenokópiou kráľikov s geneticky podmieneným sfarbením srsti typ "albino" (biela).

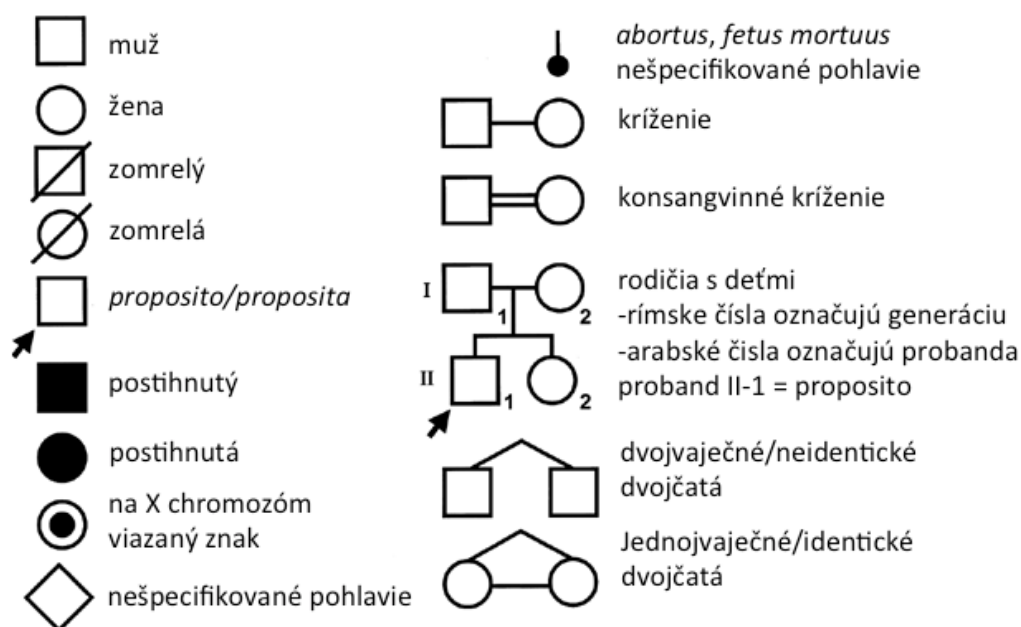


**Obrázok 2.2: Zmena sfarbenia srsti kráľika himalájskeho v dôsledku účinku chladu.** Za normálnych okolností sú sfarbené na čierne len extremity: končatiny, ušnice, chvost a nos. Po vyholení srsti na malej ploche v chrbtovej oblasti a priložení obkladu naplneného ľadom sa indukuje syntéza termosenzitívneho enzýmu (aktívny len pri nižších teplotách) zodpovedného za syntézu pigmentu. Preto je novovytvorená srst' kráľika sfarbená na čierne. Prevzaté a modifikované z <http://marshscience7.blogspot.ro/2013/10/dna-structure.html>.

## 2.1.2. Praktické problémy pri genetickej analýze familiárnej formy Parkinsonovej choroby

Znížená penetrancia, variabilná expresivita, prítomnosť heterozygotov majúcich len jednu mutovanú PD-asociovanú alelu s recesívnym typom dedičnosti (napr. *PRKN* alebo *PINK1*), no aj napriek tomu postihnutých PD, ako aj prítomnosť PD fenokópií v PD v rodinách (vyvolaných vplyvom neznámych environmentálnych faktorov resp. genetických faktorov, ktoré sú iné ako primárny genetický komponent zodpovedný za výskyt PD v rodine), to všetko komplikuje genetickú analýzu a určenie správneho spôsobu dedičnosti (Klein a Westenberger, 2012). Pôsobením týchto vplyvov sa môže stať, že AR forma dedičnosti PD je interpretovaná ako AD forma napríklad preto, lebo minimálne v troch generáciách po sebe nedošlo k preskočeniu generácie, ktoré je typické pre AR. Preto dostatočná genealogická retrospektíva s čo najväčším vertikálnym (počet generácií), ale aj horizontálnym (zistenie genetických súvislostí v rámci členov jednej generácie) záchyтом v kombinácii s precíznou klinickou diagnostikou sú nevyhnutným predpokladom pre stratifikáciu a korektnú interpretáciu genetického rizika v konkrétnych rodinách.

Ďalej sa pozrieme na konkrétne rodokmene PD rodín. Ešte predtým je ale potrebné sa oboznámiť so symbolmi štandardne používanými pri zostavovaní rodokmeňov. Tieto sú popísané na Obrázku 2.3.



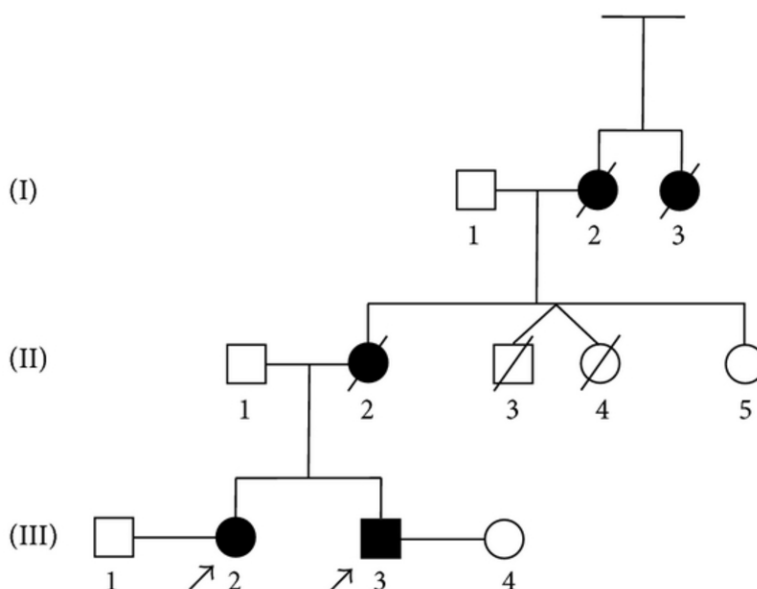
Obrázok 2.3.: Symboly používané pri zostavovaní rodokmeňov.

### 2.1.2.1. Autozomálne dominantná dedičnosť Parkinsonovej choroby s variabilnou penetranciou

Ako už bolo spomenuté autozomálne dominantný typ dedičnosti je charakteristický pre mutantné alely PD-asociovaných génov *SNCA* (p.A30P, p.E46K, p.H50Q, p.G51D a p.A53T; Siddiqui *et al.*, 2016; skratky názvov aminokyselín a pravidiel popisu sekvenčných variant sú uvedené v prílohách, Appendix 4 a 5) a *LRRK2* (p.G2019S, p.R1441C, p.R1441G, p.I2020T a p.Y1699C; Hernandez *et al.*, 2016, <https://emedicine.medscape.com/article/1994368-overview>).

*SNCA* mutácie sú extrémne zriedkavé. Boli identifikované len pri menej ako 0.1% PD pacientov. Patologický nález v mozgu PD pacientov nesúcich mutáciu v alele *SNCA* génu *post mortem* zahŕňa mnohopočetné  $\alpha$ -synukleín-pozitívne neuronálne inklúzie (Lewyho telieska a neurity). Klinický obraz PD pacientov nesúcich *SNCA* mutácie varíruje od fenotypu podobnému klasickej idiopatickej forme PD až po atypické agresívne formy PD, ktoré okrem klasickej parkinsonskej symptomatiky charakterizuje myoklonus, ťažké poškodenie autonómneho systému a demencia (Singleton *et al.*, 2013). Od roku 2003 sú za autozomálne dominantnú príčinu PD považované aj duplikácie a triplikácie *SNCA* (Gasser, 2015). Duplikácie *SNCA* vedú k PD s klasickým fenotypom, zatiaľ čo triplikácie tohto génu vedú k ťažkým a fenotypicky komplexnejším, rapídne progredujúcim (vek prežívania 5 – 10 rokov) formám PD, neraz spojeným s vážnou kognitívnou deklináciou (Ibáñez *et al.*, 2009). Uvedené názorne ilustruje vplyv dózy (množstva) génového produktu na komplexnosť fenotypu AD-formy PD. Pri AD spôsobí dedičnosti mutantný (chorobný) znak (fenotyp) zpravidla nepreskakuje generácie (Obrázok 2.4). Penetrancia PD mutantných alel génov *SNCA* a *LRRK2* je jasne korelovaná s vekom pacientov. Napríklad, mutácia p.G2019S v géne *LRRK2* má penetranciu 28% vo veku 59 rokov, 51% vo veku 69 rokov a 74% vo veku 79 rokov. Mutácia p.R1441G v géne *LRRK2* má odhadovanú penetranciu 13% vo veku 65 rokov a vo veku 80 rokov sa zvyšuje až na 83% (Healy *et al.*, 2008, Ruiz-Martínez *et al.*, 2010). Penetranciu môžu ďalej ovplyvňovať iné gény (gény modifikátory), ale aj pohlavie pacienta, etnická príslušnosť alebo environmentálne vplyvy (Trinh *et al.*, 2014a, Trinh *et al.*, 2014b, Marder *et al.*, 2015). Napríklad, nositelia mutácie p.G2019S v géne *LRRK2* v populácii Ashkenazi Židov majú vek nástupu PD (57,9 rokov) porovnateľný s tuniskými Berbermi (57,1 rokov), zatiaľ čo vek nástupu PD podmienený touto mutáciou v nórskej populácii je signifikantne vyšší, 63 rokov (Trinh *et al.*, 2014a). Penetrancia p.G2019S v géne *LRRK2* sa pohybuje od 26% až po takmer 100% (Marder *et al.*, 2015). Frekvencia tejto mutácie je na

úrovni 1% pri sporadickej PD a 4% pri familiálnej forme PD. V prípade Ashkenazi Židov sa p.G2019S mutácia vyskytuje až v približne 18% diagnostikovaných PD prípadov (Alcalay *et al.*, 2013). Celkovo sú *LRRK2* mutácie zodpovedne za 5 – 15% autozomálne dominantných, familiálnych foriem PD a 1 – 3 % sporadických PD. Za spomenutie ešte stojí vysoká frekvencia mutácie p.R1441G v populácii baskických PD pacientov (Mata *et al.*, 2005).



**Obrázok 2.4: Rodokmeň reálnej PD-postihnutej rodiny z Talianska (Ferese *et al.*, 2015).** Jedná sa o príklad autozomálne dominantného typu dedičnosti. Konkrétne ide o prenos *SNCA* triplikátu (4q22.1). Postihnutí jedinci boli diagnostikovaní s ťažkou parkinsonskou symptomatikou: skorým nástupom dyskinézie, psychiatrickou symptomatikou a progredujúcou deklináciou kognitívnych schopností. V prípade triplikácie génu *SNCA* sa jedná o vysoko-penetrantnú aberáciu.

#### 2.1.2.2. Autozomálne recesívna dedičnosť Parkinsonovej choroby s variabilnou penetranciou

Homozygotné alebo navzájom komplementujúce heterozygotné mutácie v každom z nasledujúcich troch génov: *PRKN* (*Parkin*, *PARK2*), *PINK1* (*PARK6*) a *DJ-1* (*PARK7*) spôsobujú autozomálne recesívne formy PD, zvyčajne bez atypických klinických znakov. Okrem toho mutácie v troch ďalších génoch: *ATP13A2* (*PARK9*), *PLA2G6* (*PARK14*), *FBXO7* (*PARK15*), spôsobujú zriedkavejšie formy recesívneho parkinsonizmu, zvyčajne s veľmi skorým nástupom (pred 30. rokom života) a atypickými klinickými príznakmi (pyramídové, dystonické, spontánne nekontrolované pohyby očí a kognitívne poruchy) (Bonifati *et al.*, 2005, Djarmati *et al.*, 2004, Lücking a Brice, 2000, Di Fonzo *et al.*, 2009, Paisan-Ruiz *et al.*, 2009, Ramirez *et al.*, 2006).

Ako už bolo spomenuté, penetrancia niektorých mutácií autozomálne dominantných PD-asociovaných génov je výrazne znížená. Pri autozomálne recesívnej dedičnosti niektoré mutantné alely PD-asociovaných génov (*PRKN*, *PINK1*) môžu v heterozygotnom stave dominantným spôsobom predisponovať ku vzniku PD, hoci s výraznou redukciou penetrancie v prípade, že sú prítomné ďalšie modifikátory (Klein *et al.*, 2007).

Mutácie v *PRKN* sú najfrekvencovanejšie a vysvetľujú až polovicu familiárnych prípadov PD s recesívnym typom dedičnosti a nástupom choroby pred dosiahnutím 45. roku života a tiež ~ 15% sporadických prípadov s nástupom pred 45. rokom života pacienta. Mutácie v génoch *PINK1* a *PARK7* sú menej časté (1 - 8% resp. 1 - 2% sporadických prípadov so skorým nástupom) (Bonifati *et al.*, 2005, Djarmati *et al.*, 2004, Lücking a Brice, 2000, Kumazawa *et al.*, 2008). Pravdepodobnosť prítomnosti mutácií v týchto génoch je funkciou veku nástupu: čím skorší je nástup ochorenia, tým vyššia je pravdepodobnosť (Singleton *et al.*, 2013). V týchto troch génoch sa v celosvetovom meradle detegovalo veľké množstvo mutácií či už bodových, ale aj komplexných na úrovni genomických prestavieb (delécie, multiplikácia). Práve posledné spomenuté sú obzvlášť časté v géne *PRKN*.

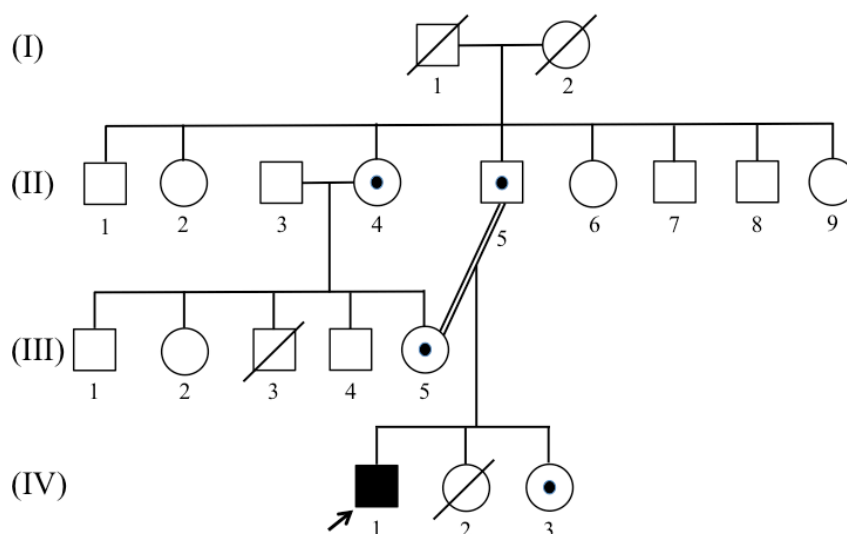
Pri niektorých pacientoch je detegovaná iba jedna heterozygotná mutácia v jednom z génov asociovaných s recesívnou PD. Tento fakt je doposiaľ ťažké objektívne interpretovať. Je možné, že takáto heterozygotná mutácia je úplne náhodná a nesúvisiaca s ochorením, čo napokon indikuje aj skríning veľkých kohort PD pacientov a kontrolných probandov. Možno je aj to, že heterozygotná mutácia v jednom z génov podmieňujúcich AR formu PD môže tiež pôsobiť ako rizikový faktor pre vznik PD. Napokon môže byť prítomná aj druhá molekulárne neidentifikovaná patogénna mutácia, komplementujúca účinok prvej mutácie v heterozygotnom stave (Lücking a Brice, 2000, Klein *et al.*, 2007, Singleton *et al.*, 2013).

Mutácie v *PRKN* géne nie sú asociované so vznikom a patológiou Lewyho teliesok. Tento fakt by mohol naznačovať rozdielnosť v patogenéze a patológii AR a AD formy PD. Avšak mutácia v *PINK1* géne už bola asociovaná so vznikom Lewyho teliesok u jedného pacienta. Tak isto novo-popísaná mutácia v géne *DJ-1*, p.L172Q, bola asociovaná so vznikom Lewyho teliesok a pridruženej patológie (Lewyho telieska, aberantné neurity, zrnité štruktúry, sféroidy a roztrúsená gliálna patológia) (Hattori *et al.*, 2000, Taipa *et al.*, 2016).

PD fenotyp spojený s mutáciami v génoch *PINK1* a *DJ-1* je viacmenej identický s PD fenotypom vyvolaným mutáciami v géne *PRKN* (prepuknutie parkinsonizmu v tretej alebo

štvrtéj dekáde života, dobrá a dlhotrvajúca odozva na terapiu levodopou, časté motorické fluktuácie, časté levodopou indukované dyskinézie). Kognitívna a vegetatívna deteriorácia je len zriedkavo súčasťou PD fenotypu vyvolaného mutáciami v uvedených troch génoch (Lohmann *et al.*, 2003, Samaranch *et al.*, 2010)

Pri zostavovaní rodokmeňov rodín s recesívnym typom PD dedičnosti sa nezriedka stretávame s konsangvinitou u rodičov pacientov (Obrázok 2.5). Na rozdiel od AD formy dedičnosti pri AR forme môže PD fenotyp preskakovať jednu, alebo aj niekoľko po sebe nasledujúcich generácií (Obrázok 2.5).

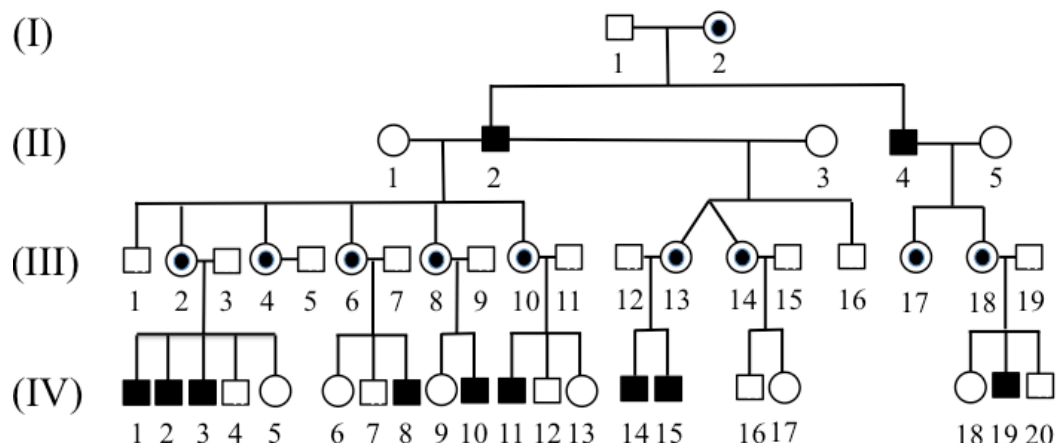


**Obrázok 2.5:** Upravený rodokmeň odvodený od rodokmeňa reálnej PD-postihnutej rodiny z Indie (Abbas *et al.*, 2016). Jedná sa o autosomálne recesívny typ prenosu mutantnej alely *PARK7/DJ-1* (p.Ile105Phe). Postihnutý muž IV.1 so skorým nástupom PD (už na začiatku tretej dekády života) vzišiel z konsangvinného kríženia druhého stupňa medzi matkou III.5 a otcom II.5. Heterozygotní príslušníci rodiny II.4, II.5, III.5 a IV.3 sú označení čiernou bodkou.

### 2.1.2.3. Na X chromozóm naviazaný recesívny typ dedičnosti Parkinsonovej choroby (na X-chromozóm naviazaná dystónia/parkinsonizmus)

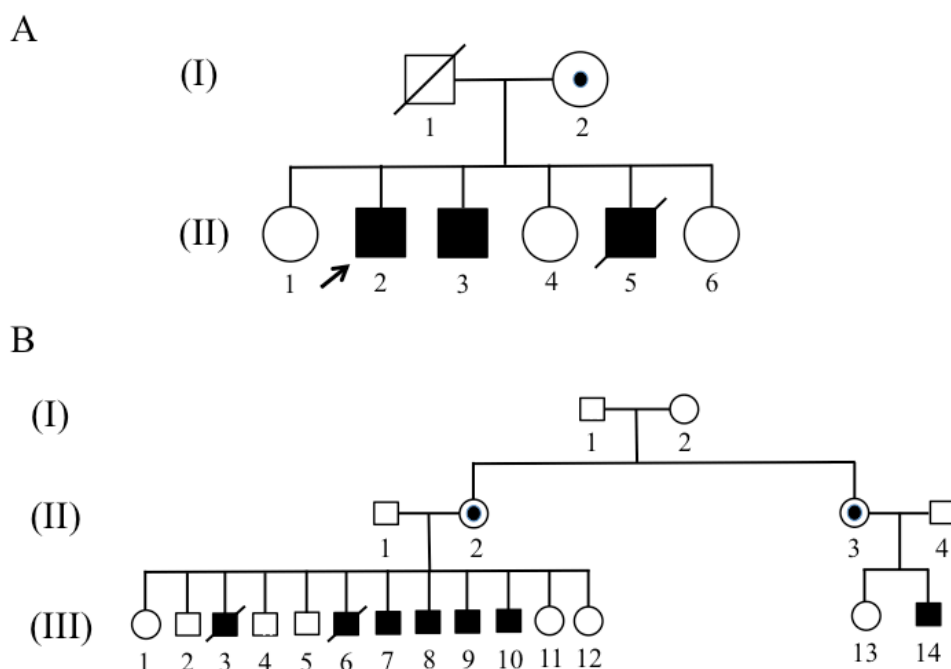
Na X chromozóm naviazaný typ dedičnosti bol pri PD popísaný len pomerne nedávno. Na obrázku 2.6 je znázornený rodokmeň rodiny postihnutej Lubag syndrómom, ktorého súčasťou sú aj parkinsonské prejavy (Lee *et al.*, 2001). Ako je možné si všimnúť mutantná alela je recesívna teda fenotypový prejav preskakuje generácie. Heterozygotné ženy, hoci samy netrpia PD ani podobným neurologickým ochorením, prenášajú mutantnú alelu ako na svoje dcéry, tak aj na synov, avšak len niektorí synovia sú postihnutí, vzhľadom na prítomnosť len jednej kópie chromozómu X v ich somatických bunkách.





**Obrázok 2.6:** Mierne upravený rodokmeň odvodený od rodokmeňa reálnej dystóniou/parkinsonismom- (Lubag syndróm) postihnutej rodiny z Filipín z ostrova Panay (Lee *et al.*, 2001). Jedná sa o gonozomálne recesívny typ prenosu mutantnej alely génu *TAF1* lokalizovaného na chromosome Xq13.1 (X-chromozómový recesívny typ dedičnosti) (Ito *et al.*, 2016). Postihnutí jedinci sú výhradne muži, pričom ženy sú prenášačkami recesívnej mutantnej alely. Podobne ako pri autozomálne recesívnom type dedičnosti fenotypický prejav mutantnej alely preskakuje generácie. Heterozygotní príslušníci rodiny sú označení čiernym krúžkom v prázdnom krúžku. Zomrelí nie sú v rodokmeni vyznačení.

Wilson *et al.*, (2014) vo svojej štúdií popísal mutácie vedúce ku skorej forme PD kombinovanej s vážnou intelektuálnou a kognitívnou deterioráciou, ktorá je recesívne dedičná s typom prenosu zodpovedajúcemu X chromozomálnej dedičnosti. Jedná sa o deléciu ( $\approx 45$  kb) vedúcu ku kompletnej strate génu *RAB39B*, ktorý kóduje malú GTPázu Rab (www.uniprot.org). Táto mutácia bola identifikovaná v austrálskej rodine (Obrázok 2.7A), v ktorej boli traja muži postihnutí PD so skorým nástupom a mentálnou retardáciou (Wilson *et al.*, 2014). V tej istej práci bola identifikovaná aj zmysel zápisu meniaci mutácia c.503C>A, (p.T168K) v géne *RAB39B*, u členov príbuzenstva zo štátu Wisconsin (USA) (Obrázok 2.7B), ktorí mali podobný fenotyp ako PD pacienti z austrálskej rodiny (Wilson *et al.*, 2014). *Post mortem* bolo preukázané, že mutácie v *RAB39B* skutočne vedú k patologicky potvrdenej PD. Mozog postihnutých vykazoval masívnu stratu dopaminergných neurónov v oblasti *substantia nigra* a klasickú Lewyho patológiu. Špecifickými patologickými znakmi boli kortikálne sformované Lewyho telieska, akumulácia železa v mozgu, tau imunoreaktivita a axonálne sféroidy (Wilson *et al.*, 2014).

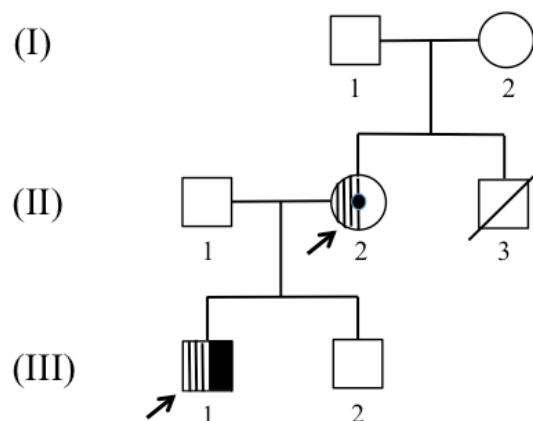


**Obrázok 2.7.:** (A) Rodokmeň reálnej rodiny z Austrálie postihnutej Parkinsonovou chorobou so skorým nástupom (Wilson *et al.*, 2014). Jedná sa o recesívny spôsob dedičnosti chýbajúcej *RAB39B* alely (*RAB39B*del) naviazaný na X chromozóm. (B) Rodokmeň reálnej rodiny z Wiskonsinu postihnutej Parkinsonovou chorobou so skorým nástupom (Wilson *et al.*, 2014). Jedná sa o recesívny spôsob dedičnosti mutantnej alely *RAB39B* p.T168K naviazaný na X chromozóm.

#### 2.1.2.4. Na X chromozóm viazaný dominantný typ dedičnosti Parkinsonovej choroby

Pri dominantnom type dedičnosti viazanej na X chromozóm sa chorobný fenotyp prejavuje u všetkých jedincov nesúcich dominantnú mutantnú alelu. V prípade, že mutantnú alelu prenáša heterozygotná matka je 50% pravdepodobnosť, že syn alebo dcéra budú postihnutí. Môže sa teda zdať, že nedochádza ku segregácii fenotypu na základe pohlavia. Ak je však postihnutý otec a matka je zdravá, potom ku prenosu mutantnej alely dochádza len na dcéry a synovia sú zdraví bez genetickej záťaže v danom znaku (fenotype). Ako príklad uvedeného môže slúžiť dedičnosť PD mutantnej alely *PGK1* p.A354P (Obrázok 2.8).

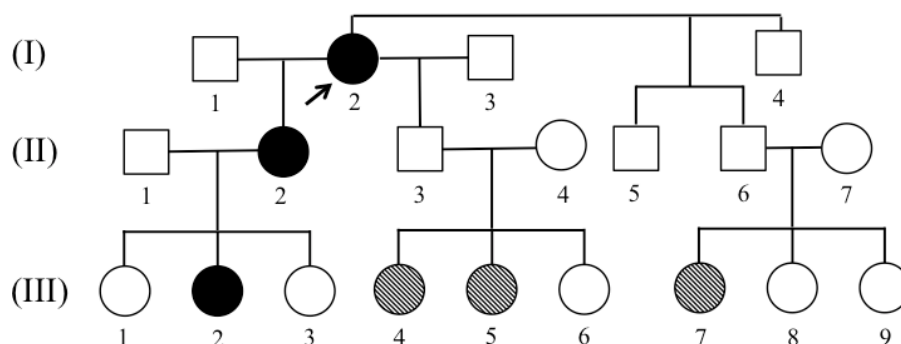




**Obrázok 2.8: Rodokmeň reálnej rodiny z Japonska postihnutej Parkinsonovou chorobou so skorým nástupom (Sakaue *et al.*, 2017).** Jedná sa o dedičnosť mutantnej alely *PGK1* (*PARK12*) p.A354P lokalizovanej na chromozóme Xq21.1. Heterozygotná matka II.2 bola diagnostikovaná so skorou formou PD vo veku 36 rokov. Jej syn III.1 bol diagnostikovaný so skorou formou PD už vo veku 9 rokov. Šrafovanie indikuje PD fenotyp; plné čierne sfarbenie hemolytickú anémiu a myopatiu spojené s deficitom PGK1. V prípade tejto rodiny sa zdá, že ide o dominantnú dedičnosť viazanú na X chromozóm, pričom je pravdepodobné, že penetrancia danej alely významne varíruje. Vzhľadom na to, že nepoznáme genotyp matky I.2, ale len jej fenotyp (zdravá), nemožeme posúdiť do akej miery je v dedičnom paterne významná expresivita.

#### 2.1.2.5. Autozomálne dominantná dedičnosť Parkinsonovej choroby v ženskej línii

Gén kódujúci guanozíntrifosfáthydrolázu *GCHI* sa nachádza na chromozóme 14q21.1-22.2. Mutantná alela génu *GCHI* c.159delG spôsobuje posun čítacieho rámca a vytvorenie stop kodónu (p.W53X). Práve táto mutácia je zodpovedná za vznik a dedičnosť dystónie typu DYT-5. DYT-5 dystónia je dedená v autozomálne dominantnom móde v ženskej línii pričom sa mutantná alela vyznačuje zníženou penetranciou a vysoko variabilnou expresivitou. Obrázok 2.9. zobrazuje rodokmeň kolumbijskej rodiny postihnutej parkinsonismom s vertikálne zhoršujúcou sa prognózou a dystóniou DYT-5 (Bernal-Pacheco *et al.*, 2013). V tejto rodine mutantná alela *GCHI* zdedená po matke spôsobuje parkinsonský fenotyp, zatiaľ čo po otcovi dystonický fenotyp. Keďže probandi mužského pohlavia v konkrétnej rodine nejavia chorobný fenotyp, je vysoko pravdepodobné, že pre rozvinutie patologického fenotypu je nutný vplyv ďalších genetických, epigenetických, poprípade stochastických faktorov, špecifických pre ženské pohlavie.



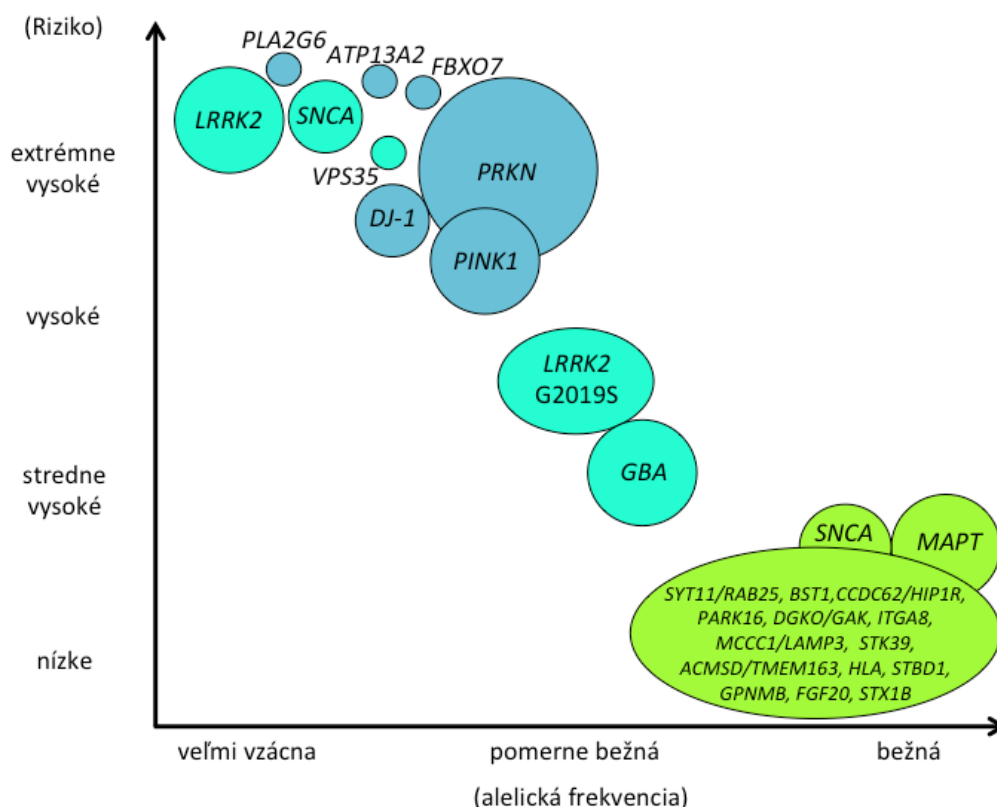
**Obrázok 2.9: Rodokmeň reálnej rodiny z Kolumbie postihnutej parkinsonizmom s vertikálne zhoršujúcou sa prognózou a dystóniou DYT-5 (Bernal-Pacheco *et al.*, 2012).** Dystónia DYT-5 je ochorenie s autozomálne dominantným typom dedičnosti, pričom sú ženy postihnuté častejšie ako muži. Matka I.2 javila príznaky typické pre parkinsonizmus od 41. roku svojho života, jej dcéra II.2 od 40. roku života a vnučka III.2 od 31. roku života. Vnučky III.4, III.5 a III.7 sú postihnuté dystóniou DYT-5 od 6. resp. 7. roku života. Plný kružok označuje parkinsonský fenotyp, šrafovaný kružok dystonický fenotyp.

### 2.1.2.6. Genetické poradenstvo

Pri genetickom poradenstve (GP) je nutné mať neustále na zreteli, že diagnóza spojená s dedičnou záťažou, predovšetkým však pri dominantnom spôsobe dedičnosti, alebo dedičnosti viazanej na X chromozóm, je diagnózou, ktorá nepostihuje len pacienta ako takého, ale celé rodiny. Pacientom a ich rodinám je preto dôležité informácie podať tak, aby: (1) objektívne reflektovali riziko prenosu, (2) pochopili fenomén penetrancie a expresivity, a v neposlednom rade (3) získali komplexnú informáciu o možnostiach konvenčnej a/alebo experimentálnej liečby, poprípade o možnostiach prevencie (Gasser, 2015). GP musí byť vždy nenátlakové a nedirektívne. Genetický poradca splní svoju úlohu vtedy, ak pacient dostane batériu informácií potrebnú na to, aby sa slobodne a poučene rozhodol či podstúpiť, alebo nepodstúpiť dostupné genetické testy. Genetické testy nesmú byť vykonané (1) bez súhlasu pacienta, (2) bez GP a (3) bez štatisticky významnej pravdepodobnosti dosiahnutia konkluzívneho výsledku.

Podľa odporúčaní Európskej Federácie Neurologických Spoločností (EFNS) by malo byť genetické testovanie v prípade PD limitované na: (1) testovanie mutácií *SNCA* a *LRRK2* u pacientov s typickým klinickým obrazom PD a jasnou dominantnou rodinnou anamnézou; (2) testovanie mutácií v génoch korelovaných s AR formou PD, to jest *PRKN*, *PINK1* a *DJ-1*, u pacientov s (A) typickou formou PD (pričom rodinná anamnéza musí byť kompatibilná s recesívnym typom dedičnosti (postihnutí súrodenci a zdraví rodičia) a vek nástupu ochorenia musí byť pod 50 rokov, alebo u pacientov s (B) typickou sporadickou formou PD a vekom nástupu pod 40 rokov. Testovanie na prítomnosť mutácií so zníženou penetranciou, ako je

napríklad variant *LRRK2* G2019S, by malo byť obmedzené len na pacientov z príslušných rizikových populácií. Testovanie vzácných monogénnych foriem PD, ktoré vedú k atypickým formám parkinsonizmu je zatiaľ možné len v rámci výskumných projektov a štúdií (Gasser, 2015). Architektúra genetiky PD vhodná ako pomôcka pre genetického poradcu je znázornená na Obrázku 2.9.



**Obrázok 2.9:** Genetická skladba Parkinsonovej choroby. Kontinuum PD-asociovaných variantov jednotlivých génov podľa sily prejavu (fenotypu) a alelických frekvencií. Veľkosť bublín je približne úmerná frekvencii PD-asociovaných aliel jednotlivých génov v populácii. Farba symbolizuje typ dedičnosti: dominantný (tyrkysová), recesívny (modrá), rizikový lokus (zelená). Modifikované z Clarimon a Kulisevsky, 2013; Gasser, 2015.

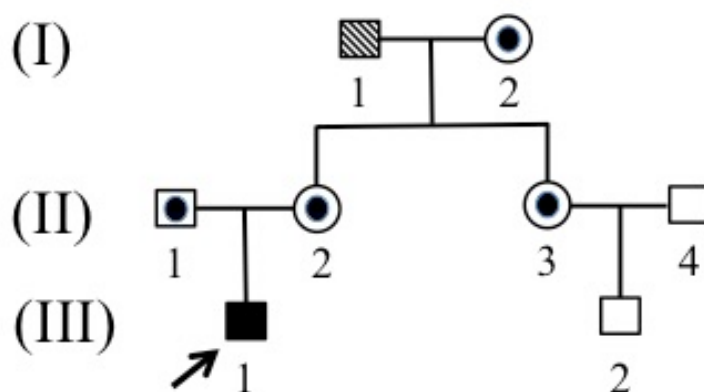
### 2.1.2.7. Fenokópie ako faktor komplikujúci genetickú analýzu

Pod fenokópiou rozumieme nededičnú zmenu fenotypu spôsobenú vonkajšími vplyvmi, ktorá je čo do prejavu podobná dedične podmienennej zmene fenotypu.

Manganizmus je ochorenie (syndróm), ktoré je svojou symptomatikou podobné, ak nie identické, s PD. Na rozdiel od PD však pacienti postihnutí manganizmom nereagujú na L-DOPA terapiu.

Pracovná expozícia zlievačov vysokým dávkam mangánu v zlievarenských výparoch (dlhodobé vdychovanie) vedie k prepuknutiu manganizmu, ktorý je charakterizovaný fenotypológiou parkinsonizmu, dystóniou, deklináciou kognitívnych funkcií a zmenami správania (Wang *et al.*, 1989). Podobné príznaky boli popísané aj u ľudí závislých od užívania mangánom-kontaminovaného efedronu (Selikhova *et al.*, 2008). Vonkajší vplyv, v našom prípade vystavenie vysokým dávkam mangánu, preto vedie k fenotypu, ktorý kopíruje fenotyp spojený s PD.

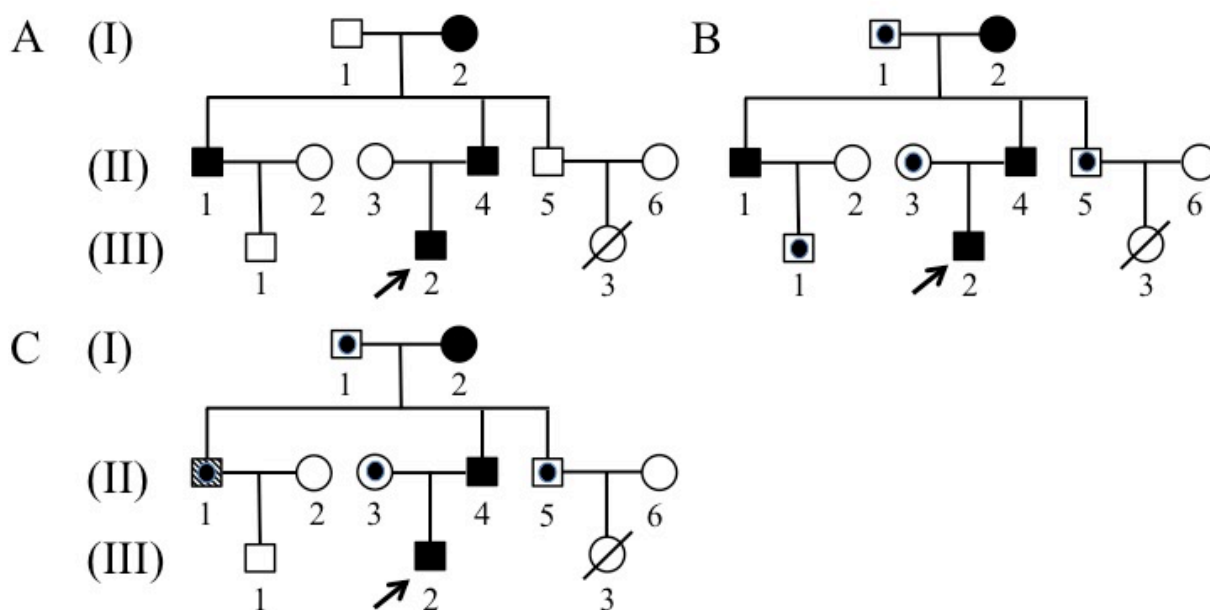
Predstavme si teda situáciu (Obrázok 2.10) kedy v I. generácii je matka (I.2) heterozygotom nesúcim jednu recesívnu PD asociovanú mutantnú alelu génu X. Fenotypovo je matka úplne zdravá. Otec pracuje v ferozliatinových závodoch ako zlievač, pričom u neho prepukli prejavy parkinsonizmu (manganizmus) v 4. dekáde jeho života. V II. generácii si jedna z dcér (II.2) vezme muža (II.1), ktorý je heterozygotom nesúcim tú istú recesívnu PD asociovanú mutantnú alelu génu X ako jej matka (I.2). V III. generácii je syn (III.1) v tretej dekáde života postihnutý PD. Vzhľadom na postihnutie starého otca (I.1), by sme bez znalosti genetického pozadia starej matky (I.2) mohli usudzovať, že vnukova (III.1) diagnóza súvisí práve s mutantným variantom genetického faktora X, ktorý zdedil po starom otcovi. Ako už ale vieme nositeľom mutantnej PD alely v I. generácii bola stará matka, pričom parkinsonský syndróm starého otca bol v skutočnosti manganizmus, teda čo do príznakov fenokópia monogénne podmienenej PD.



**Obrázok 2.10.: Rodokmeň rodiny, v ktorej fenokópia (I.1) prekrýva skutočného nositeľa mutantnej alely (I.2). Šrafovanie označuje manganizmus, fenotypový komplex v prevažnej miere prekrývajúci fenotyp PD.**

Predstavme si ďalšiu možnú situáciu. V I. generácii je matka (I.2) postihnutá PD, ktorá stratila svojich rodičov ešte ako dieťa. V II. generácii sú dvaja synovia (II.1 a II.4) tejto matky postihnutí PD na prelome tretej a štvrtej dekády života. Tretí syn (II.5) je zdravý. Všetci traja

pracujú vo ferozliatinovom závode. Zdravý syn (II.5) je úradník, pričom dvaja postihnutí synovia pracovali jeden ako zlievač (II.1), druhý ako skladník (II.4). V tretej generácii je postihnutý syn (III.2) otca (II.4), ktorý bol skladníkom, pričom syn (III.1) otca (II.1) zlievača je zdravý. Otec (II.5) úradník mal síce dcéru (III.3), tá ale zomrela ešte v juvenilnom veku. Na prvý pohľad by sme vzhľadom na to, že postihnutí PD boli rodinní príslušníci v každej generácii mohli uvažovať o dominantnej dedičnosti mutantnej PD alely génu X. Reálne ale môžu byť na základe tohoto opisu viaceré scenáre zobrazené na Obrázku 2.11A-C.



**Obrázok 2.11.: (A) Rodokmeň bez prítomnosti fenokópie A. (B) Rodokmeň bez prítomnosti fenokópie B. (C) Rodokmeň s prítomnosťou fenokópie.** Šrafovanie označuje manganizmus, fenotypový komplex v prevažnej miere prekrývajúci fenotyp PD.

Scenár 1: Matka (I.2) v I. generácii je skutočne heterozygotom nesúcim mutantnú alelu s AD typom dedičnosti. Potom jej obaja synovia (II.1 a II.4) postihnutí PD sú tak isto heterozygoti pre danú dominantnú PD alelu génu X. Tretí syn (II.5) je homozygot nesúci dve alely divého typu génu X. V III. generácii je syn (III.1) otca zlievača (II.1) homozygotom nesúcim dve “zdravé” alely. Syn (III.2) otca skladníka (II.4) je opäť heterozygotom nesúcim jednu kópiu PD dominantnej alely. Dcéra (III.3) otca úradníka (II.5) zomrela predčasne z dôvodov bez spojitosti s PD. V prípade, že by sa dožila vyššieho veku a ochorela na PD, potom táto nebola spôsobená mutantnou PD alelou jej starej matky (I.2).

Scenár 2: Matka (I.2) v I. generácii je homozygotom nesúcim dve mutantné alely s AR dedičnosťou. Potom jej obaja synovia (II.1 a II.4) postihnutí PD sú tak isto homozygoti pre

danú recesívnu alelu génu X, čo ďalej indikuje, že ich otec (I.1) je heterozygotom nesúcim jednu kópiu tejto PD alely. Tretí syn (II.5) je heterozygot. V III. generácii je syn (III.1) otca zlievača (II.1) heterozygotom pre danú AR dedičnú mutantnú PD alelu génu X. Syn (III.2) otca skladníka (II.4) je opäť homozygotom, a teda jeho matka musela byť zdravým heterozygotom pre predmetnú PD recesívnu alelu. Zosnulá dcéra III.3 heterozygotného otca II.5 mohla byť heterozygotom pre danú PD alelu alebo homozygotom, a to v prípade, že matka (II.6) bola tak isto heterozygotným nosičom mutantnej PD alely génu X. Vzhľadom na predčasnú smrť dcéry (III.3) úradníka (II.5) bez spojitosti s PD a chýbajúcu informáciu o genotype jej zdravej matky (II.6), by ďalšia špekulácia o genotype dcéry bola bez diagnostického a prediktívneho merita.

Scenár 3: Matka (I.2) v I. generácii je homozygotom nesúcim dve identické mutantné PD alely s AR spôsobom dedičnosti. Jej syn (II.1) je heterozygotom a jej druhý syn (II.4) je homozygotom nesúcim mutantnú PD alelu zdedenú ako po matke tak aj po otcovi (I.1). Ako je ale možné, že syn (II.1) zlievač trpí parkinsonským syndrómom aj napriek tomu, že mutantná alela, ktorá je prítomná v tejto rodine sa dedí v autozomálne recesívnom móde? Vzhľadom na pracovnú expozíciu syna (II.1) je pravdepodobné, že výpary vznikajúce pri zlievaní kovov, spomedzi nich najviac mangánu, spôsobili ochorenie poškodzujúce CNS s fenotypom v mnohom zhodným s PD, tzv. manganizmom. Tretí syn (II.5) je heterozygot. V III. generácii je syn (III.1) otca zlievača (II.1) zdravým homozygotom pre alelu divého typu génu X. Syn (III.2) otca skladníka (II.4) je opäť homozygotom ale pre mutantnú recesívnu PD alelu, a teda jeho matka musela byť zdravým heterozygotom pre predmetnú PD recesívnu alelu. Zosnulá dcéra III.3 heterozygotného otca II.5 mohla byť heterozygotom pre danú PD alelu alebo homozygotom, a to v prípade, že matka (II.6) bola tak isto heterozygotným nosičom mutantnej PD alely génu X. Vzhľadom na predčasnú smrť dcéry (III.3) úradníka (II.5) bez spojitosti s PD a chýbajúcu informáciu o genotype jej zdravej matky (II.6), nemá žiadny zmysel diskutovať o genotype dcéry. Dôležitým momentom v tomto rodokmeni je fakt, že syn (III.1) je zdravým homozygotom pre alelu divého typu. To znamená, že jednu zdedil od otca (II.1) a jednu od matky (II.2), a teda otec (II.1) musí byť heterozygotom nesúcim ako dominantnú alelu divého typu, tak aj recesívnu PD alelu, zdedenú po svojej matke (I.2). Fenotypovo by mal byť otec (II.1) zdravý, takže parkinsonismus, ktorý sa u neho prejavil, pravdepodobne nesuvisí s recesívnou PD alelou zdedenou od matky (I.2) a zrejme bolo ochorenie vyvolané vplyvom pracovnej expozície tak, ako je tomu v tomto prípade.

Predošlé scenáre ilustrujú nevyhnutnosť súčinnosti klasických geneticko-genealogických analýz s molekulárnymi analýzami, bez ktorých by dnes genetické poradenstvo bolo pri chorobách s komplikovaným geneticko-environmentálnym pozadím ako je napríklad PD nemožné.

### 3. Gény asociované s autozomálne dominantnou formou Parkinsonovej choroby

PD-asociované varianty génov s AD typom dedičnosti je možné identifikovať pozičným klonovaním vo veľkých príbuzenstvách. AD dedičné varianty obyčajne nesú mutácie, ktoré významne menia zmysel, a teda aj štruktúru a funkciu nimi kódovaných proteínov. Popríklad ide o mutácie, ktoré vytvorením predčasného stop kodónu významne skracujú čítací rámec a vedú k tvorbe neúplného (skráteneho) proteínu, ktorý neplní svoju funkciu. Niekedy sa môže jednať aj o mutácie na vyššej chromozomálnej úrovni, kedy dochádza k prestavbe celých chromozomálnych úsekov. Ako príklad môže slúžiť génová multiplikácia (napr. duplikácia alebo triplikácia úseku obsahujúceho gén *SNCA*). Kauzálné mutácie sú obyčajne segregované v rodinách u jedincov postihnutých PD. Ako bolo uvedené, PD patrí medzi ochorenia, ktorých genetika je komplikovaná, a nie vždy sa riadiaca pravidlami Mendelovej dedičnosti. Do dnešnej doby len mutácie v génoch *SNCA* a *LRRK2* boli **jednoznačne** asociované so vznikom a etiopatogenezou PD, hoci aj ďalšie v nasledujúcom texte popísané mutantné gény vykazujú značnú mieru asociácie s PD.

#### 3.1. $\alpha$ -Synukleín (*SNCA*)/PARK1(4)

Gén *SNCA* bol popísaný ako prvý gén asociovaný s PD s Lewyho patológiou pri genetickej analýze Contursi príbuzenstva v Taliansku (Polymeropoulos *et al.*, 1996). PD sa u postihnutých prejavuje v tomto príbuzenstve medzi piatou a šiestou dekadou života a je podmienená prítomnosťou dominantnej alely génu *SNCA* vedúcej k substitúcii p.A53T. *SNCA* je proteín prítomný v rôznych bunkových typoch s doposiaľ nejasnou funkciou. *SNCA* bol okrem iného identifikovaný ako kľúčová zložka Lewyho teliesok (Williams-Gray *et al.*, 2013).

Ako ďalšie autozomálne dominantné alely *SNCA* spojené so vznikom PD boli popísané: (1) p.E46K vedúca k PD v tretej až piatej dekáde života a (2) p.A30P vedúca k PD piatej až siedmej dekáde života (Zarranz *et al.*, 2004, Krüger *et al.*, 1998). Relatívne nedávno bola identifikovaná PD-asociovaná substitúcia p.H50Q. Histidín v pozícii 50 zohráva zrejme dôležitú úlohu v modulácii účinku  $\text{Cu}^{2+}$  na agregáciu *SNCA* (Villar-Piqué *et al.*, 2017). Substitúcia p.H50Q bola popísaná ako mutácia, ktorá urýchľuje agregáciu *SNCA* (Ghosh *et al.*, 2013). Ďalšia substitúcia v *SNCA* p.G51D (c.152 G>A) bola popísaná v rodine z Francúzska ako príčina vzniku parkinsonského syndrómu s nezvyčajným PD fenotypom



charakterizovaným skorým nástupom choroby, miernou odpoveďou na terapiu levodopou, rýchlou progresiou ochorenia vedúcou k strate autonómie a smrťou v priebehu niekoľkých rokov, výraznými pyramídovými znakmi vrátane bilaterálnych extensorových plantárnych reflexov, príležitostne spasticitou a často psychickými symptómami. Patologické lézie prevládali v bazálnych gangliách a pyramídových dráhach a zahŕňali jemné, difúzne cytoplazmatické inklúzie obsahujúce fosfo-SNCA v povrchových vrstvách mozgovej kôry vrátane entorinálnej kôry. Funkčné štúdie ukázali, že SNCA G51D oligomerizuje pomalšie a jeho vlákna sú toxickéjšie ako vlákna proteínu divého typu (Lesage *et al.*, 2013).

Ako už bolo spomenuté, duplikácia a triplikácia *SNCA* vedú k PD s AD formou dedičnosti a skorým nástupom v piatej (duplikácia) respektíve štvrtej (triplikácia) dekáde života. Expresia *SNCA* je úmerná počtu kópií prítomného génu, čo vedie k zvýšenej produkcii *SNCA* a k príčinnému zvýšeniu fenotypovej účinnosti (Miller *et al.*, 2004).

Prevalencia tzv. mendelovských familiárnych *SNCA* mutácií je extrémne nízka a zhodnotenie jej percentuálneho podielu na familiárnych alebo idiopatických prípadoch PD je zložité (Mullin a Schapira, 2015). Jednou z príčin je fakt, že niektoré polymorfizmy v *SNCA* sú asociované so vznikom idiopatickej formy PD ako hlavný variantný rizikový faktor (Simón-Sánchez *et al.*, 2009). Expanzia *SNCA-Rep1*, polymorfného mikrosatelitu *SNCA* génu, je spojená so zvýšeným rizikom sporadického PD. Cronin a kolektív (2009) ukázali, že *Rep1* reguluje expresiu *SNCA* a to tak, že stimuluje jeho transkripciu v nervovom systéme dospelého a vyslovili domnienku, že expandovaná *Rep1* alela v homozygotnom stave môže simulovať multiplikáciu *SNCA* lokusu, a teda zvyšovať riziko vzniku PD.

Postavenie *SNCA* v modeli patogenézy PD je centrálné. Predpokladá sa, že schopnosť *SNCA* agregovať sa je kľúčom k jeho patogénnym vlastnostiam, pričom oligoméry a fibrilárne intermediáty *SNCA* sú považované za zdroj bunkovej toxicity. Abnormálne zložená, agregovaná forma *SNCA* sa správa ako prión, a teda je schopná šíriť svoju aberantnú štruktúru aj do priľahlých buniek (Desplats *et al.*, 2009).

Napriek tomu, že *SNCA* hrá dôležitú úlohu v patogeneze PD, jeho fyziologická funkcia je dodnes pochopená len minimálne. *SNCA* je členom rodiny synukleínov, ktorá okrem *SNCA* zahŕňa aj *SNCB* ( $\beta$ ) a *SNCG* ( $\gamma$ ). Synukleíny sú vysoko exprimované v mozgu a  $\alpha$ - a  $\beta$ -synukleíny selektívne inhibujú fosfolipázu D2. *SNCA* pravdepodobne funguje ako integrátor presynaptického signálu a membránovej výmeny. Zdá sa, že *SNCA* reguluje transport a uvoľňovanie dopamínu. *SNCA* je hlavným komponentom amyloidových plakov v

mozgu pacientov s Alzheimerovou chorobou, čo má pravdepodobne priamu spojitosť so schopnosťou SNCA indukovať polymerizáciu protofibríl s mikrotubulami-asociovaného proteínu  $\tau$  (tau). SNCA redukuje neuronálnu odpoveď na proapoptotické a apoptotické stimuly, čo vedie k zníženej aktivácii kaspázy 3. Gén SNCA podlieha alternatívneho zotrúhu. Funkcia jednotlivých izoformiem zatiaľ nie je známa ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)).

V súčasnosti, keď sa mnohé z degeneratívnych ochorení, PD nevynímajúc, označujú ako takzvané sekundárne mitopatie (sekundárne mitochondriálne ochorenia) je často diskutovanou témou úloha SNCA v mitochondriálnej homeostáze (MH). Hoci mnohé funkcie SNCA v MH sú stále len v rovine hypotéz a úvah, je napríklad už viac ako desaťročie známe, že SNCA je v dôsledku vnútrobunkovej acidifikácie spôsobenej napríklad metabolickým a/alebo oxidatívnym stresom translokovaný z cytosolu na povrch vnútornej mitochondriálnej membrány, kde sa viaže na molekuly kardiolipínu, ktoré boli exponované v dôsledku zníženého pH (Cole *et al.*, 2008). Aktuálny model zapojenia SNCA do MH kladie dôraz na obojsmernosť a previazanosť medzi SNCA a MH, čo konkrétne znamená, že tak deteriorácia MH vedie k akumulácii a oligomerizácii SNCA, ako aj zvýšená prítomnosť SNCA v bunke k rozvratu MH (Di Maio *et al.*, 2016). Di Maio a kolektív (2016) ukázali, že sa niektoré posttranslačné upravené varianty SNCA viažu s vysokou afinitou na TOM20 (centrálny komponent translokázy vonkajšej mitochondriálnej membrány, ktorá rozpoznáva a translokuje v cytoplazme syntetizované mitochondriálne preproteíny) a bránia jeho interakcii s TOM22, čím zabraňujú importu mitochondriálnych proteínov do mitochondrie. TOM20 spolu s TOM22 fungujú ako tranzitný peptidický receptor na povrchu vonkajšej mitochondriálnej membrány a zabezpečujú pohyb preproteínov do translokačného póru tvoreného TOM40 ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Dôsledkom SNCA-mediovej inhibície interakcie medzi TOM20 a TOM22 je narušené mitochondriálne dýchanie, zvýšená produkcia ROS a strata mitochondriálneho membránového potenciálu. *Post mortem* bola skúmaním PD mozgového tkaniva odhalená aberantná interakcia SNCA s TOM20 v nigrostriatálnych neurónoch (Di Maio *et al.*, 2016).

Prítomnosť SNCA v krvi a mozgovomiechovej tekutine je v súčasnosti kandidátnym PD biomarkerom najmä z hľadiska identifikácie včasného alebo prodromálneho štádia PD (Mullin a Schapira, 2015).

### 3.2. “Leucine Rich Repeat“ kináza 2 (LRRK2)/PARK8

Mutácie v géne *LRRK2* sú najčastejšou genetickou príčinou vedúcou ku vzniku PD s neskorým nástupom. Prvá PD-relevantná mutácia v *LRRK2* bola identifikovaná v japonskej rodine s autozomálne dominantným parkinsonizmom v roku 2002 (Funayama *et al.*, 2002). V krátkom čase na to boli v globálnom meradle popísané aj ďalšie kauzálne mutácie v *LRRK2*, vedúce alebo predisponujúce ku vzniku PD (Zimprich *et al.*, 2004). Dodnes boli so vznikom PD asociované minimálne tieto mutantné varianty *LRRK2*: p.N1437H, p.R1441C/G/H, p.Y1699C, p.I2020T a p.G2019S, pričom posledný uvedený je najfrekvencovanejší (Paisan-Ruiz *et al.*, 2013). Penetrancia mutantných alelovariant génu *LRRK2* je vysoko variabilná a ako už bolo uvedené závisí od mnohých premenných (napr. vek, rasa, atď.). Globálne boli mutácie v *LRRK2* detegované v 1% až 5% pacientov s idiopatickou (sporadickou) formou PD a približne v 5%-20% pacientov s dedičnou familiárnou formou PD (Correia Guedes *et al.*, 2010, Mullin a Schapira 2015). Prevalencia jednotlivých mutantných variant *LRRK2* značne varíruje a je vysoko závislá od etnickej príslušnosti.

Mutantné alely *LRRK2* sa podieľajú na patogenéze nielen PD, ale aj Crohnovej choroby (chronického zápalového ochorenia čriev), rakoviny a malomocenstva (variant p.M2397T koreluje s excesívnou prozápalovou odpoveďou u leprotikov) (Lewis a Manzoni, 2012, Fava *et al.*, 2016). PD asociovaná s *LRRK2* variantmi je obvyčajne pomaly progredujúcim neurodegeneratívnym ochorením, pre ktoré je charakteristická bradykinézia, rigidita, pokojový tremor, postojová nestabilita, strata dopaminergných neuronov v oblasti *substantia nigra* (nigrostriálna degenerácia) a v niektorých prípadoch aj prítomnosť neurofibrilárnych  $\tau$ -pozitívnych lézií a Lewyho teliesok.

*LRRK2* je cytosolický multifunkčný proteín doposiaľ s nie úplne pochopenými funkciami z pohľadu komplexnej bunkovej fyziológie. Zatiaľ vieme, že pozitívne reguluje autofágiu prostredníctvom  $\text{Ca}^{2+}$ -závislej aktivácie CaMKK/AMPK ( $\text{Ca}^{2+}$ -dependentná proteín kináza kináza/adenozyln monofosfátom (AMP)-aktivovaná proteín kináza (AMPK)) signálnej dráhy (Gómez-Suaga *et al.*, 2012). Tento process zahŕňa aktiváciu NAADP receptorov, zvýšenie lyzozomálneho pH a vyplavenie  $\text{Ca}^{2+}$  z lyzozómov. *LRRK2* hrá spolu s RAB29, úlohu v retrográdnej výmennej kaskáde recyklácie proteínov, (napríklad manóza-6-fosfátového receptora (M6PR) medzi lyzozómami a Golgiho aparátom (GA) (Cui *et al.*, 2017).

LRRK2 zohráva úlohu v transporte synaptických vezikúl a fosforylácii peroxyredoxínu 3 (PRDX3). LRRK2 obsahuje ako kinázu, tak aj GTPázovú doménu a pravdepodobne fosforyluje proteíny, ktoré sú kľúčové pre vznik PD.

### **3.3. “Vacuolar Protein Sorting” asociovaný proteín 35 (VPS35)/PARK17**

V roku 2011 bol identifikovaný typický parkinsonizmus v rade nemeckých, švajčiarskych a rakúskych rodín, pričom ochorenie bolo autozomálne dominantne dedičné ale s neúplnou penetráciou. “Next generation” sekvenovanie odhalilo varianty VPS35 p.D620N, p.P316S a p.R524W spôsobujúce PD. Z doterajších štúdií je zjavné, že patogenita mutantných variantov génu *VPS35* je vysoká (Mullin a Schapira, 2015). Mutantné varianty VPS35 sú zosumarizované v Tabuľke 3.1.

VPS35 je súčasťou retroméru (Obrázok 3.1, Obrázok 3.2). To ako sa PD-varianty VPS35 podieľajú na vzniku PD je nejasné. Jeden z možných mechanizmov zahŕňa moduláciu vývoja dopaminergných neurónov prostredníctvom Wnt signálnej kaskády a aberantnú akumuláciu železa v mozgu ako konsekvenciu aberantného DMT1 signalingu (Mullin a Schapira, 2015).

Hoci boli identifikované VPS35 mutácie vedúce k dysfunkcii retroméru, ktoré zjavne prispievajú k vzniku a rozvoju PD, naše chápanie molekulárnych a bunkových mechanizmov neurodegenerácie závislej od VPS35 je zatiaľ stále veľmi obmedzené. Doteraz neboli popísané žiadne mutácie skracujúce sekvenciu VPS35 proteínu (“truncations”), poprípade preskupenia alebo delécie v géne *VPS35*. Toto spolu s dominantným modelom dedičnosti PD-asociovaných alelovariantov *VPS35* naznačuje, že heterozygotné mutácie *VPS35* by mohli potenciálne pôsobiť buď: (1) mechanizmom získanej novej toxickej funkcie, (2) dominantne-negatívnym mechanizmom spojeným s čiastočnou alebo úplnou stratou primárnej funkcie, alebo (3) prostredníctvom haploinsuficientného mechanizmu vedúceho k čiastočnej strate funkcie (Williams *et al.*, 2017).

**Tabuľka 3.1: Distribúcia a frekvencia PD-relevantných mutantných variánt VPS35 (prebrané z Williams *et al.*, 2017).**

Mutácia	Región s prítomnosťou mutácie	Frekvencia v PD kohorte	Nájdená v kontrolách?
p.D620N	Švajčiarsko	24/14126	Nie
	Rakúsko		
	USA		
	Tunis		
	Jemenský židia		
	Veľká Británia		
	Francúzsko		
	Japonsko		
	Nemecko		
	Iné		
p.P316S	USA	2/106	Áno (1/3309)
p.R524W	Rakúsko	1/860	Nie
p.L774M	Rakúsko	8/9730	Áno (3/7527)
	Nemecko		
p.R32S	Španielsko	1/134	Neudané
p.I560T	Belgicko	1/592	Nie
p.H599R	Belgicko	1/592	Nie
p.M607V	Belgicko	1/592	Nie
p.G51S	Kórea	5/9495	Áno (2/6513)
	Nórsko		
	Iné		

Až donedávna neboli popísané iné funkčné interakcie medzi PD-relevantnými génmi ako tá medzi *PRKN1* a *PINK1*. V roku 2015 Dhungel a kolektív identifikovali genetickú interakciu medzi dvoma PD-relevantnými génmi, *VPS35* a *EIF4G1* (eukaryotický transláciu

iniciujúci faktor 4 Y1); konkrétne ukázali, že nadregulácia *EIF4G1* koreluje s funkčnými aberáciami, ktoré sú dôsledkom nesprávneho poskladania bielkovín. Tá istá skupina tiež ukázala, že expresia VPS35 “downstream” efektora, sortilínu, neutralizuje toxický efekt proteínového “misfoldingu” na bunku, čo naznačuje potenciálnu úlohu sortilínov v etiopatogenéze PD (Dhungel *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2010). V neposlednom rade Dhungel a kolektív (2015) ukázali, že delécia VPS35 zosilnila  $\alpha$ -synukleínovú toxicitu v bunke.

### 3.3.1. Retromér v Parkinsonovej chorobe

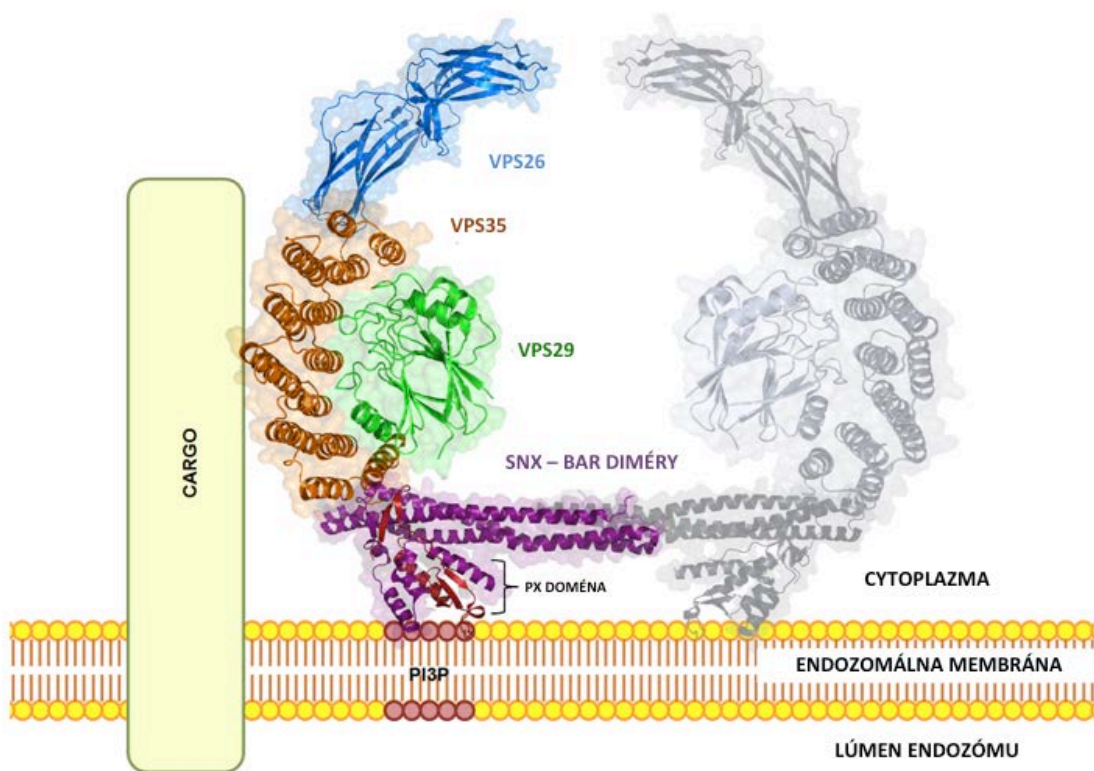
Retromér je definovaný ako proteínový komplex obsahujúci triediaci (“sorting”) komponent, zložený z nexínov (SNX) a vakuolárne proteíny-triediacych (VPS) komponentov. Má podstatnú úlohu pri recyklácii “cargo” molekúl z endozómov do trans-Golgi kompartmentu a taktiež umožňuje niektoré recyklačné procesy medzi endozómom a cytoplazmatickou membránou (www.nature.com). Retromér je konzervovaný v eukaryotoch počnúc kvasinkami až po človeka (Williams *et al.*, 2017)

Retromérový superkomplex (Obrázok 3.1.) je zložený z dvoch komplexov: (1) náklad- (“cargo”)-selektívneho trimerického komplexu (CSC), zloženého z VPS26, VPS29 a VPS35, zodpovedného za naviazanie a “sorting” proteínového nákladu, a (2) triediaceho- (“sorting”)-nexínového diméru, ktorý v cicavčích bunkách kanonicky pozostáva z nexínov SNX1 alebo SNX2 a SNX5 alebo SNX6, a ktorý je zodpovedný za spojenie retromérového komplexu s endozomálnou membránou (Obrázok 3.2.; Hierro *et al.*, 2007, Bonifacino a Hurley, 2008, Seaman 2012).

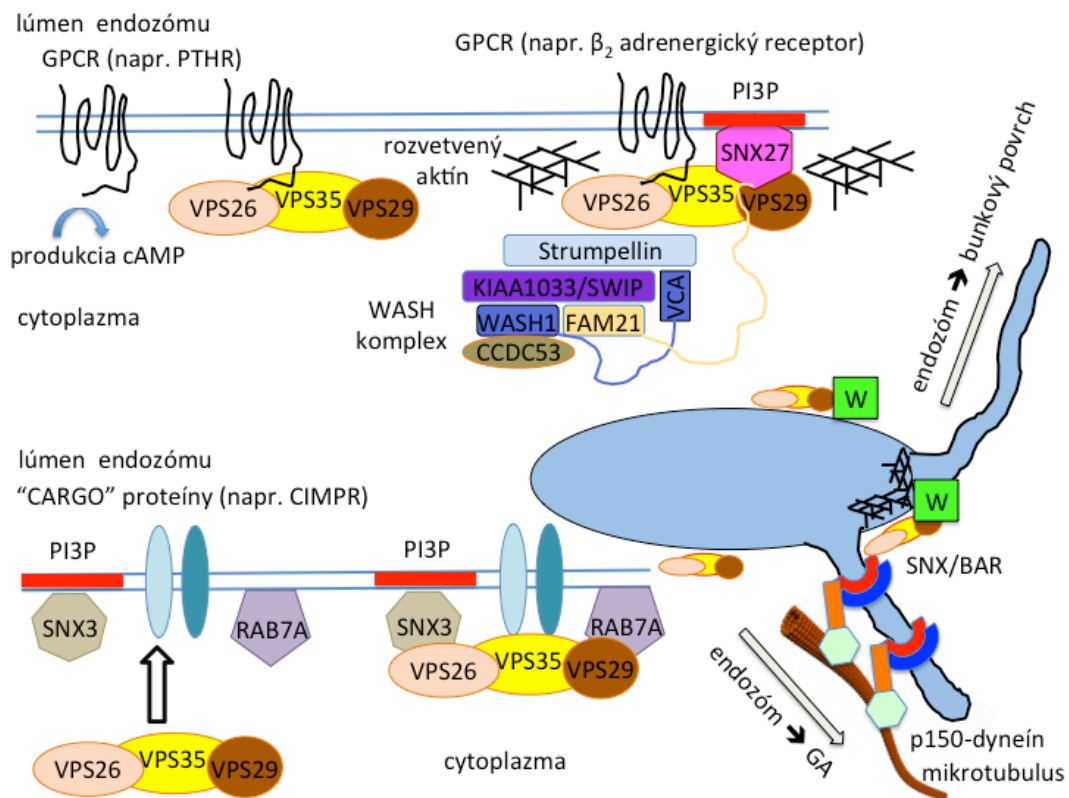
VPS35 pozostáva zo 796 aminokyselín a je najväčším spomedzi CSC proteínov. VPS35 je vysoko-flexibilný proteín, ktorý má štruktúru  $\alpha$ -solenoidu, rozkladajúceho sa po celej dĺžke proteínu.  $\alpha$ -solenoidová štruktúra je dôležitá pre väzbu VPS29 podjednotky CSC, ktorej štruktúra zahŕňa metalo-fosfoesterázovú doménu, ktorá sa viaže na C-terminálny koniec VPS35 (Bonifacino a Hurley, 2008). N-koncová časť VPS35 je zodpovedná za väzbu na VPS26 prostredníctvom motívu PRLYL (Gokool *et al.*, 2007). CSC sa spája s dimérom SNX.

SNX proteíny patria do rodiny SNX-BAR, pričom pozostávajú z domén BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) a PX (“phox homology”). Tieto pomáhajú pri asociácii retromérov s endozomálnou membránou (Bonifacino a Hurley, 2008). Konkrétne, oblasť BAR sníma zakrivenie membrány a jej prípadný remodeling a PX doména sa viaže na fosfatidylinozitol 3-

fosfát (PI3P) na membráne (Cullen a Korswagen, 2011, Willaims *et al.*, 2017). Produkciu PI3P zabezpečuje fosfoinoitol-3-kináza (PI3K) VPS34, ktorá je dôležitým regulátorom autofágie, trimerického G-proteínového signalingu a mTOR signálnej kaskády v bunkách. PI3K VPS34 je funkčná v podobe tetramerického komplexu pozostávajúceho z VPS34, VPS15 (Serín/Treonín-proteín kináza), BCL-1 (beclin-1) a buď Atg14 (pre autofágiu relevantný protein 14, VPS34 komplex I), alebo UVRAG (s UV-rezistenciou asociovaný gén, VPS komplex II), ktorý je regulovaný BCL-1 a RAB5 (Rojas *et al.*, 2008, Ruck *et al.*, 2011, Backer, 2016). Po aktivácii VPS34 fosforyluje fosfatidylinozitol, čo vedie k produkcii PI3P v endozomálnej membráne, ktorá tak môže viazať “downstream” ciele vrátane proteínov RAB7A a SNX (Rojas *et al.*, 2008).



**Obrázok 3.1: Štruktúra komplexu retroméru.** Prevzaté a modifikované z [https://en.wikipedia.org/wiki/Retromer#/media/File:Retromer\\_protein\\_complex.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Retromer#/media/File:Retromer_protein_complex.png).



**Obrázok 3.2: Retromér v “sortingu” (triedení) endozomálnych proteínov.** “Cargo”-(náklad)-selektívny komplex retroméru (CSCR) pracuje v režime vyhľadávania a triedenia nákladu (napr. CI-MPR alebo sortilínu) určeného na transport z endozómu do Golgiho aparátu (GA). Interakcia retroméru s nákladom (proteínmi) si vyžaduje jeho “pritiahnutie” k endozomálnej membráne, čo je proces sprostredkovaný RAB7A a SNX3. Heterodimér triediacich nexínov (SNX) pozostávajúci z SNX-BAR proteínov SNX1, alebo SNX2 a SNX5, alebo SNX6 umožňuje tvorbu tubulov pričom sa viaže na mikrotubuly prostredníctvom komplexu p150-dyneín. Podkomplex CSCR (VPS35-VPS29-VPS26) interaguje s komplexom WASH, ktorý sprostredkúva produkciu rozvetvených aktínových vlákien na povrchu endozómov. CSC spolu s SNX27 a komplexom WASH zabezpečujú recykláciu GP2-adrenergického receptora GPCR a iných proteínov, vrátane integrínu  $\alpha 5 \beta 1$ , v smere z endozómu na bunkový povrch. Navše CSCR reguluje tiež signálnu aktivitu iného GPCR, konkrétne receptora paratyroidného hormónu (PTHr). Prevzaté a modifikované z Seaman, 2012.

Interakcia CSC s dimérom SNX je slabá na vytvorenie stabilného spojenia s endozómom, preto RAB7A slúži ako “prídavná kotva” upevňujúca retromér k endozomálnej membráne (Seaman 2012, Williams *et al.*, 2017).

CSC môže okrem SNX a RAB7A interagovať aj s inými proteínmi v špecifických endozomálnych triediacich dráhach. Napríklad, CSC môže interagovať s WASH (Wiskott-Aldrich syndróm a SCAR homológ) pentamérnym komplexom, zloženým z WASH1 (pôsobí ako nukleáciu-podporujúci faktor na povrchu endozómov, kde viaže a aktivuje Arp2/3 komplex a aktivuje polymerizáciu aktínu, zohráva kľúčovú úlohu pri fragmentácii tubulov, ktoré slúžia ako transportné intermediáty počas endozomálneho sortingu; <https://genecards.weizmann.ac.il/v3/cgi-bin/carddisp.pl?gene=WASH1>, Derivery *et al.*, 2009,



Monfregola *et al.*, 2010), strumpellínu, FAM21, CCDC53 a KIAA1033/SWIP, a mediováť tak transport “carga” v dráhach: (1) endozóm do trans-Golgi kompartmentu, ako aj (2) endozóm do cytoplazmatickej membrány (Seaman *et al.*, 2013). Komplex WASH interaguje s retromérom prostredníctvom neštrukturovaného konca FAM21 a C-konca VPS35, pričom táto interakcia zabezpečuje selekciu “carga” (napr. kation-nezávislého manóza-6-fosfát receptora (CI-MPR) určeného na transport v dráhe endozóm do trans-Golgi kompartmentu. Alternatívne môže komplex WASH interagovať s retromérom a SNX27. Táto interakcia zabezpečuje selekciu “carga” (napr.  $\beta$ 2-adrenergického receptora ( $\beta$ 2AR), alebo glukózového transportéra 1 (GLUT1) určeného na transport v dráhe z endozómu do cytoplazmatickej membrány (Williams *et al.*, 2017).

Doposiaľ sú skúmané tri možné spôsoby VPS35-asociovej neurodegenerácie: (1) neschopnosť vytvárať superkomplexy s WASH komplexom a s tým spojená aberantná autofágia, (2) nefunkčná recyklácia AMPA receptora (AMPA; iónotropný transmembránový receptor glutamátu, ktorý sprostredkováva rýchly synaptický prenos vzruchu), a (3) aberantná mitochondriálna výmena (mitochondriálna homeostáza) (Williams *et al.*, 2017).

- (1) McGough a kolektív (2014) ukázali pomocou izotermálnej calorimetrie, že primárnym defektom súvisiacim s PD-asociovanou mutantnou formou VPS35 p.D620N je zhruba  $2.2 \pm 0.5$  násobné zníženie afinity retroméru pre podjednotku WASH komplexu, konkrétne FAM21. Táto práca v podstate definuje molekulárny defekt, ktorý negatívne moduluje interakciu CSC s WASH a odhaľuje funkčný deficit v transportnej dráhe endozóm do trans-Golgi kompartmentu, ktorý je zjavne jednou z možných príčin vzniku PD.
- (2) Munsie a kolektív (2015) zistili, že VPS35 je lokalizovaný v dendritických výbežkoch kde sa zúčastňuje transportu a recyklácie excitabilných glutamátových receptorov (AMPA). Fundamentálne neuronálne procesy, ktoré zahŕňajú synaptický prenos signálu, povrchovú expresiu AMPAR a jeho synaptický “recycling” sú pozmenené pri nadexpresii VPS35. VPS35 p.D620N je “loss-of-function” mutácia vzhľadom na funkciu VPS35 v regulácii synaptického prenosu vzruchu a recyklácie AMPAR v myších kortikálnych neurónoch a dopaminergných neurónoch-podobných bunkách vytvorených z indukovaných pluripotentných kmeňových buniek izolovaných z nositeľov mutácie p.D620N (Munsie *et al.*, 2015). Takéto poruchy funkcie synáps pravdepodobne vedú k chronickej poruche

neurónovej sieti, ktorá môže vyústiť do neurodegenerácie v podobe parkinsonizmu, alebo neurodegenerácie akéhokoľvek iného typu.

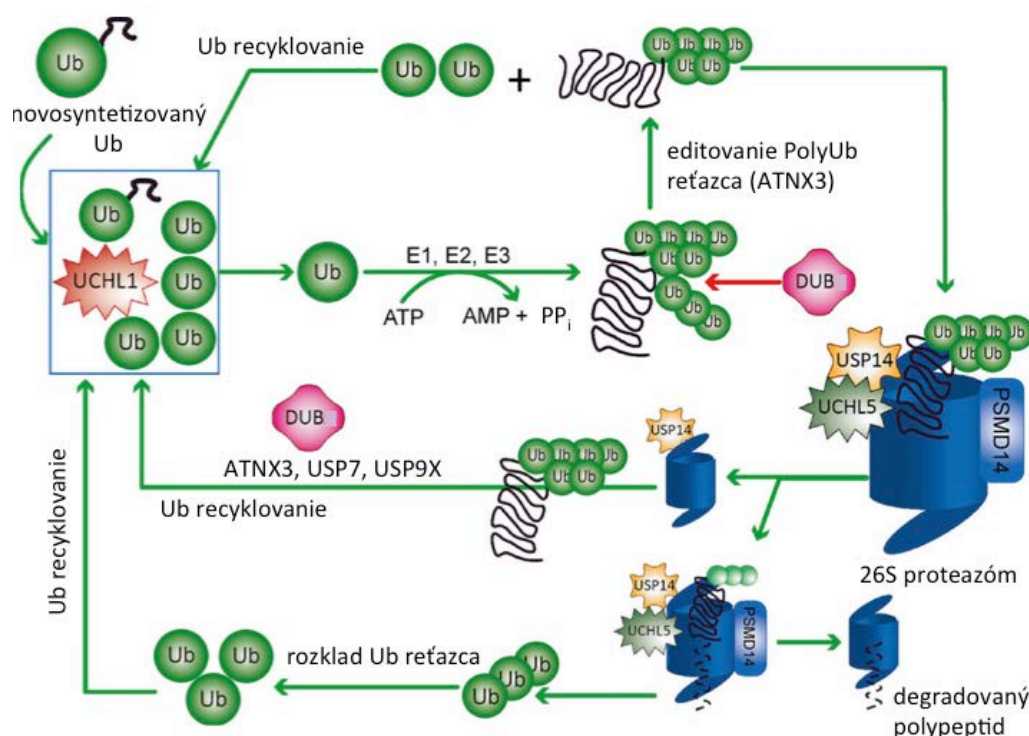
- (3) Wang a kolektív (2016) ukázali, že PD-asociované VPS35 mutácie spôsobujú mitochondriálnu fragmentáciu a bunkovú smrť v neurónoch kultivovaných *in vitro*, v myších neurónoch zo *substantia nigra in vivo* a v ľudských fibroblastoch získaných od pacienta s PD, ktorý nesie mutantnú alelu VPS35, p.D620N. VPS35-indukovanému mitochondriálnemu deficitu a neuronálnej dysfunkcii by mohla zabrániť inhibícia procesu mitochondriálnej fragmentácie. PD relevantné VPS35 mutanty vykazujú zvýšenú interakciu s proteínom podobným dynamínu (DLP) 1, ktorý zvyšuje recykláciu mitochondriálnych DLP1 komplexov prostredníctvom transportu vezikúl derivovaných z mitochondrií do lyzozómov, kde sú degradované. Aj oxidačný stres zvyšuje interakciu VPS35 s DLP1. Táto bola tiež zvýšená v mozgoch ľudí s diagnostikovanou sporadickou PD. Výsledky Wanga a kolektívu (2016) poukázali na nový bunkový mechanizmus prepájajúci esenciálny komponent retroméru, VPS35 a proces mitochondriálnej fragmentácie. Dysregulácia tohoto mechanizmu sa pravdepodobne podieľa na patogenéze ako familiárnej tak aj sporadickéj formy PD.

### 3.4. Ubikvitín karboxyl-terminálna hydroláza L1 (UCHL1)/PARK5

Ubikvitín-(Ub)-proteazómový systém je dôležitým bunkovým mechanizmom, ktorý ubikvitínuje poškodené proteíny v bunke a degraduje ich prostredníctvom 26S proteazómu. Aberácie v tejto dráhe môžu viesť k proteínovej agregácii a boli asociované s PD (Healy *et al.*, 2004).

Deubikvitinázy štiepia ubikvitín na karboxy-terminálnom glycíne Gly-76. Ubikvitín karboxyl-terminálna hydroláza L1 (UCHL1) patrí do rodiny C12 peptidáz ([www.genecards.com](http://www.genecards.com)) a podieľa sa jednak na spracovaní ubikvitínových prekursorov, ale spracováva aj ubikvitinované proteíny (Obrázok 3.3). Tiež sa viaže na voľný monoubikvitín (mUb), ktorý stabilizuje a tým zabraňuje jeho degradácii v lyzozómoch. Homodimér UCHL1 môže pôsobiť aj ako ATP-nezávislá ubikvitín ligáza (Liu *et al.*, 2002, [www.genecards.org](http://www.genecards.org)). UCHL1 je exprimovaná prevažne v mozgu a neuroendokrinnom systéme pričom tvorí 1-2%

celkového mozgového solubilného proteínu (Wilkinson *et al.*, 1989).



**Obrázok 3.3: UCHL1 v komplexnom procese deubikvitinácie.** Za degradáciu nesprávne zložených proteínov zodpovedajú rôzne deubikvitinázy (DUB). Novo vytvorený ubikvitín (Ub), ktorý fúzuje s C-terminálnym koncom peptidov, je štiepený UCHL1. UCHL1 udržiava stabilnú zásobu monoubikvitínu (mUb) a dodáva Ub na ubikvitináciu nesprávne zložených proteínov. Kaskáda enzýmov zložená z Ub-aktivujúceho enzýmu (E1), konjugačného proteínu (E2) a Ub-proteín ligázy (E3) sa podieľa na tvorbe polyubikvitínových (polyUb) reťazcov/značiek na substrátových proteínoch. Polyubikvitínovaný reťazec je modifikovaný DUB, ako je napríklad ATNX3 (ataxin-3). ATNX3 deubikvitinuje dlhé polyUb reťazce, pričom má nízku, alebo žiadnu aktivitu v prípade, že polyUb reťazec pozostáva zo štyroch alebo menej Ub zvyškov). V bunke slúži ako “kontrolór kvality” zabezpečujúci správne rozpoznanie substrátových proteínov proteazómom 26S. mUb uvoľnený ATNX3 je spätne zrecyklovaný do rezerv mUb. DUB vrátane USP14 (“ubiquitin specific peptidase 14”, je súčasťou proteazómu) pracujú dvoma spôsobmi: (I) USP14 svojou deubikvitinázovou aktivitou a len málo pochopenými alosterickými vplyvmi zabráňuje degradácii polyUb proteínov proteazómom 26S (Kim a Goldberg, 2017), zatiaľ čo DUB ako napríklad USP7, ATNX3 a USP9X uľahčujú deubikvitináciu polyUb reťazcov a recykláciu mUb; a (II) USP14 môže tiež pracovať v proteazóme v kombinácii s inými DUB vrátane PSMD14 (“Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 14”) a UCHL5, a tak degradovať nesprávne zložené proteíny na malé peptidy (Kim a Goldberg, 2017). PolyUb reťazec je následne rozložený na mUb a zrecyklovaný. Obrázok bol prevzatý a modifikovaný z Gadhave *et al.*, 2016.

Expresia *UCHL1* je regulovaná prostredníctvom NF- $\kappa$ B. Dysfunkcia *UCHL1* bola identifikovaná pri mnohých neurodegeneratívnych ochoreniach (napríklad: PD, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba) (Zhang *et al.*, 2014, Nazé *et al.*, 2002). Transdukcia *UCHL1* fúzaného s transdukčnou doménou HIV-transaktivátora (TAT) v experimentoch prinavrátila normálnu enzymatickú aktivitu a funkčnosť synáps ako v hipokampálnych rezoch ovplyvnených oligomérnym amyloidom  $\beta$  (A $\beta$ ) tak aj v amyloid-prekursor-protein/presenilin-1 (APP/PS1) myšom modeli Alzheimerovej choroby. Navyše, intraperitoneálne podanie fúzneho proteínu zlepšilo udržanie schopnosti kontextuálneho učenia v APP/PS1 myšom

modeli (Gong *et al.*, 2006). Pozitívny účinok UCHL1 fúzneho proteínu súvisí s obnovením normálneho množstva regulačnej podjednotky  $\Pi_\alpha$  proteín kinázy A (PKA), PKA aktivity, a úrovne fosforylácie “cAMP response element binding” (CREB) proteínu (Gong *et al.*, 2006).

V súvislosti s PD a neurodegeneráciou boli identifikované tri mutácie v *UCHL1*, konkrétne p.I93M s pravdepodobnou (nepotvrdenou) autozomálne dominantnou formou dedičnosti, p.E7A (s pravdepodobnou autozomálne recesívnou formou dedičnosti) a p.S18Y (Leroy *et al.*, 1998, Ragland *et al.*, 2009, Bilguvar *et al.*, 2013, Lee a Hsu, 2017). *UCHL1* p.I93M bola popísaná u súrodencov v nemeckej rodine s históriou PD (Leroy *et al.*, 1998, Wintermeyer *et al.*, 2000). UCHL1 p.I93M má zníženú hydrolytickú aktivitu *in vitro*, čo je pravdepodobne aj dôvodom, prečo je táto mutantná forma zodpovedná za vyššie riziko vzniku PD. Izoleucín v pozícii 93 (Ile-93) sa nachádza v hydrofóbnom jadre UCHL1 (Bishop *et al.*, 2016). Metionín (Met) je o niečo menej objemný v porovnaní s Ile, pretože nie je rozvetvený. Substitúcia p.I93M nemá drastický vplyv na štrukturálne vlastnosti enzýmu, pretože tak Ile ako aj Met je hydrofóbný (Irby D., <https://collab.its.virginia.edu>). Ile-93 sa však nachádza na rovnakom  $\alpha 3$  helixe ako cysteín v pozícii 90 (Cys-90). To znamená, že už aj malá iregularita môže mať značné účinky na katalytickú aktivitu UCHL1 a môže objasniť jej zníženú hydrolytickú aktivitu (Irby D. na <https://collab.its.virginia.edu>).

V podmienkach *in vitro* bolo ukázané, že dimér-závislá ligázová aktivita UCHL1 zodpovedá za polyubikvitináciu  $\alpha$ -synukleínu na lysine v pozícii 63 (Lys-63), čo môže inhibovať jeho degradáciu a teda podporovať jeho akumuláciu a agregáciu v neurónoch (Liu *et al.*, 2002). Naopak, variant UCHL1 p.S18Y, ktorý sa spája so zníženým rizikom vzniku PD, má signifikantne redukovanú ligázovú aktivitu, čo vedie k zníženiu množstva ubikvitinovaného  $\alpha$ -synukleínu v neurónoch (Liu *et al.*, 2002).

Najnovší výskum naznačuje, že UCHL1 môže ovplyvniť autofágiu prostredníctvom interakcie s MAP1A/1B ľahkým reťazcom 3 (LC3). PD-relevantný mutant UCHL1 p.I93 M s defektnou deubikvitinázovou aktivitou nedokáže inhibovať formovanie autofagozómu, čo nie je prípadom divej formy UCHL1 (Yan *et al.*, 2018).

Mutácia UCHL1 p.E7A síce nespôsobuje PD v pravom zmysle slova, avšak je zodpovedná za vznik neurodegeneratívneho syndrómu v detskom veku, ktorý charakterizuje slepota, cerebelárna ataxia, nystagmus, titubácie, dysfunkcia PCML a spasticita spojená s

dysfunkciou vyšších motorických dráh (Bilguvar *et al.*, 2013). Bilguvar a kolektív (2013) použitím izotermálnej titračnej kalorimetrie ukázali, že prečistený UCHL1 p.E7A, v porovnaní s divým typom vykazuje približne sedemnásobne nižšiu afinitu pre Ub. *In vitro*, táto mutácia viedla k takmer úplnej strate hydrolázovej aktivity UCHL1 (Bilguvar *et al.*, 2013). Výsledkom interferencie medzi zníženou afinitou k Ub a takmer úplnou stratou hydrolázovej aktivity UCHL1 p.E7A je viac ako stonásobná redukcia funkčnosti mutanta v porovnaní s divým typom (Bilguvar *et al.*, 2013).

Inhibícia UCHL1 aktivity má odlišný účinok na  $\alpha$ -synukleín v neurónoch, ktoré exprimujú normálne množstvá  $\alpha$ -synukleínu a v neurónoch, ktoré exprimujú zvýšené množstvá  $\alpha$ -synukleínu. Za fyziologických podmienok majú odchýlky v UCHL1 aktivite výrazný efekt na distribúciu a množstvo presynaptického  $\alpha$ -synukleínu, ktorý môže mať detrimentálny účinok na normálnu funkciu neurónov. Naopak, za patologických podmienok sa strata UCHL1 funkcie javí ako prospešná, pretože nielen že zvyšuje úroveň degradácie  $\alpha$ -synukleínu, ale súčasne uvoľňuje proces autofágie spod inhibície mediovanej  $\alpha$ -synukleínom (Cartier *et al.*, 2012).

Súčasný poznatky o zapojení mutantných variantov UCHL1 do patogenézy PD sú nedostatočné na to, aby sme mohli suspektné UCHL1 PD varianty označiť ako jednoznačne kauzálne, a preto je ďalší výskum viac než žiaduci.

### 3.5. Glukocerebrozidáza (GBA1)

Glukocerebrozidáza je lyzozomálny enzým, ktorý katalyzuje hydrolýzu sfingolipidu glukocerebrozidu na ceramid a glukózu (Beutler *et al.*, 1992). Expresia GBA1 bola detegovaná vo všetkých testovaných typoch buniek ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). Podobne ako iné lyzozomálne proteíny, aj GBA1 je syntetizovaná v drsnom endoplazmatickom retikule (dER), ale na rozdiel od väčšiny iných lyzozomálnych proteínov jej transport z dER do lyzozómu nie je sprostredkovaný manóza-6-fosfát receptorom, ale lyzozomálnym membránovým proteínom 2 (LIMP2). GBA1 sa viaže na luminálnu “coil-coil” doménu LIMP2 pri neutrálnom pH v ER a tento komplex je súdržný až do momentu jeho importu do lyzozómu, kde pri nízkom pH disociuje (Reczek *et al.*, 2007, Migdalska-Richards a Schapira, 2016). GBA1 je glykozylovaná na štyroch z piatich Asn zvyškov, konkrétne Asn19, Asn59, Asn146,

a Asn270, avšak nie v pozícii Asn462. Mutačnou analýzou bolo zistené, že len Asn19 je esenciálny pre katalytickú aktivitu GBA1 (Berg a Fussman *et al.* 1993).

Deficit GBA1 vedie ku vzniku Gaucherovej choroby (GD). Doposiaľ bolo identifikovaných viac ako 300 patogénnych mutácií v *GBA1*, vrátane bodových mutácií, mutácií ovplyvňujúcich miesta zostrihu, delécií, inzercií a rekombinantných genomických prestavieb vedúcich ku vzniku chimérnych alel pozostávajúcich zo sekvencií *GBA1* génu a pseudogénu *psGBA1* (Hruska *et al.*, 2008). *psGBA1* je lokalizovaný približne 16 kb za *GBA1* a zdieľa približne 96% podobnosť s kódujúcou sekvenciou funkčného génu *GBA1* (Horowitz *et al.*, 1989).

Asociácia medzi GBA1 a PD vznikla na základe zistenia, že u pacientov s GD je neúmerne vyššie riziko vzniku PD ako vo zvyšnej populácii (Halperin *et al.* 2006). GBA1 PD-relevantné mutácie spôsobujú ako v homozygotnom tak aj v heterozygotnom stave 20- až 30-násobné zvýšenie rizika vzniku PD a odhaduje sa, že približne 5% až 10% PD pacientov sú nositelia mutantnej alely GBA1 (Sidransky *et al.*, 2009, Bultron *et al.*, 2010, McNeill *et al.*, 2012, Migdalska-Richards a Schapira, 2016). Je však dôležité podotknúť, že podľa súčasných odhadov sa PD rozvinie u takmer 30% spomedzi všetkých nositeľov mutantnej PD-relevantnej *GBA1* alely pred dovŕšením veku 80 rokov (Lesage a Brice 2009, Lesage *et al.*, 2011, McNeill *et al.*, 2012).

Prenos PD-GBA1 mutantných alel kopíruje autozomálne pseudo-dominantný spôsob dedičnosti s variabilnou penetranciou (Anheim *et al.*, 2012), čo potvrdzuje aj zistenie, že ako homozygoti tak aj heterozygoti nesúci PD-relevantné *GBA1* alely avšak bez klinického potvrdenia PD, majú prodromálne znaky PD. Medzi ne patrí zníženie olfaktorických funkcií, kognitívnych schopností a abnormálne výsledky motorických testov (McNeill *et al.* 2012). Pozorovanie pacientov s diagnostikovanou GD (typ 1 bez postihnutia CNS) a heterozygotných nositeľov *GBA1* mutantných alel v dĺžke dvoch rokov odhalilo signifikantné zhoršenie skóre pre depresie, REM spánkovú poruchu, kogníciu, olfakciu, a motorické skóre v oboch skupinách (Beavan *et al.* 2015).

Exaktný mechanizmus, ktorým *GBA1* PD-relevantné mutácie prispievajú k zvýšeniu rizika vzniku PD je neznámy. Vzhľadom k tomu, že klinická manifestácia a patologický nález

u pacientov s GBA1-formou PD a idiopatickou formou PD sú viac-menej identické, sa predpokladá, že tak ako v prípade idiopatickej PD hrá dôležitú úlohu akumulácia  $\alpha$ -synukleínu, rozvrat mitochondriálnej homeostázy, znefunkčnenie autofágie, neuroinflamácia, oxidatívny stres, a ER stres (Schapira a Tolosa, 2010).

## 4. Literatúra

- Abbas MM, Govindappa ST, Sudhaman S, *et al.* Early Onset Parkinson's disease due to DJ1 mutations: An Indian study. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016; 32:20-4.
- Aguirre JD, Dunkerley KM, Lam R, *et al.* Impact of altered phosphorylation on loss of function of juvenile Parkinsonism-associated genetic variants of the E3 ligase parkin. *J Biol Chem.* 2018; 293(17):6337-48.
- Alcalay RN, Mirelman A, Saunders-Pullman R, *et al.* Parkinson disease phenotype in Ashkenazi Jews with and without LRRK2 G2019S mutations. *Mov Disord.* 2013; 28(14):1966-71.
- Alexander G, Crutcher MD, DeLong MR. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, “prefrontal” and “limbic” functions. *Prog. Brain Res.* 1990; 85:119–46.
- Anglade P, *et al.* Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol. Histopathol.* 1997; 12:25–31.
- Angot E, Steiner JA, Hansen C, *et al.* Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol.* 2010; 9:1128–38.
- Anheim M, Elbaz A, Lesage S, *et al.* Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers. *Neurology.* 2012; 78(6):417-20.
- Backer JM. The intricate regulation and complex functions of the Class III phosphoinositide 3-kinase Vps34. *Biochem J.* 2016; 473(15):2251-71.
- Beard JD, Steege AL, Ju J, *et al.* Mortality from Amyotrophic Lateral Sclerosis and Parkinson's Disease Among Different Occupation Groups — United States, 1985–2011. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2017; 66(27): 718-22.
- Beavan M, McNeill A, Proukakis C, *et al.* Evolution of prodromal clinical markers of Parkinson disease in a GBA mutation-positive cohort. *JAMA Neurol.* 2015; 72(2):201-8.
- Berg D, Postuma RB, Adler CH, *et al.* MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2015; 30:1600–11.
- Berg-Fussman A, Grace ME, Ioannou Y, Grabowski GA. Human acid beta-glucosidase. N-glycosylation site occupancy and the effect of glycosylation on enzymatic activity. *J Biol Chem.* 1993; 268(20):14861-6.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science.* 1990; 249:1436–38.
- Bernal-Pacheco O, Oyama G, Briton A, *et al.* A Novel DYT-5 Mutation with Phenotypic Variability within a Colombian Family. *Tremor Other Hyperkinet Mov (NY).* 2013; 3: tre-03-138-4462-2.
- Beutler E, West C, Gelbart T. Polymorphisms in the human glucocerebrosidase gene. *Genomics.* 1992; 12(4):795-800.
- Bilguvar K, Tyagi NK, Ozkara C, *et al.* Recessive loss of function of the neuronal ubiquitin



hydrolase UCHL1 leads to early-onset progressive neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(9):3489-94.

Bishop P, Rocca D, Henley JM. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1): structure, distribution and roles in brain function and dysfunction. *Biochem J*. 2016; 473(16):2453-62.

Bonifacino JS, Hurley JH. Retromer. *Curr Opin Cell Biol*. 2008; 20(4):427-36.

Bonifati V. Genetics of Parkinson's disease. *Minerva Med*. 2005; 96(3):175-86.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, *et al*. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003; 24(2):197-211.

Bronstein JM, Tagliati M, Alterman RL, *et al*. Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Arch. Neurol*. 2011; 68:165.

Brundin P, Melki R, Kopito R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2010; 11:301-7.

Bultron G, Kacena K, Pearson D, *et al*. The risk of Parkinson's disease in type 1 Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis*. 2010; 33(2):167-73.

Burre J. The synaptic function of alpha-synuclein. *J. Parkinsons Dis*. 2015; 5:699-713.

Carlsson A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev*. 1959; 11(2, Part 2):490-3.

Cartier AE, Ubhi K, Spencer B, *et al*. Differential effects of UCHL1 modulation on alpha-synuclein in PD-like models of alpha-synucleinopathy. *PLoS One*. 2012; 7(4):e34713.

Cenci MA. Presynaptic mechanisms of l-DOPA-induced dyskinesia: the findings, the debate, and the therapeutic implications. *Front. Neurol*. 2014; 5:242.

Chaudhuri KR, Schapira AH. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol*. 2009; 8:464-74.

Chen CC, Kühn AA, Hoffmann KT, *et al*. Oscillatory pallidal local field potential activity correlates with involuntary EMG in dystonia. *Neurology*. 2006; 66:418-20.

Chu Y, Kordower JH. Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: is this the target for Parkinson's disease? *Neurobiol. Dis*. 2007; 25:134-49.

Chu Y, Dodiya H, Aebischer P, *et al*. Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiol. Dis*. 2009; 35:385-98.

Clarimón J, Kulisevsky J. Parkinson's disease: from genetics to clinical practice. *Curr Genomics*. 2013; 14(8):560-7.

Cole NB, DiEuliis D, Leo P, *et al*. Mitochondrial translocation of alpha-synuclein is promoted by intracellular acidification. *Exp. Cell Res*. 2008; 314:2076-89.

Correia Guedes L, Ferreira JJ, Rosa MM, *et al*. Worldwide frequency of G2019S LRRK2 mutation in Parkinson's disease: a systematic review. *Parkinsonism Relat Disord*. 2010;

16(4):237-42.

Cotzias GC, Van Woert MH, Schiffer LM. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med*. 1967; 276(7):374-79.

Cronin KD, Ge D, Manninger P, *et al*. Expansion of the Parkinson disease-associated SNCA-Rep1 allele upregulates human alpha-synuclein in transgenic mouse brain. *Hum Mol Genet*. 2009; 18(17):3274-85.

Cui Y, Yang Z, Teasdale RD. The functional roles of retromer in Parkinson's disease. *FEBS Lett*. 2018; 592(7):1096-112.

Cullen PJ, Korswagen HC. Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat Cell Biol*. 2011; 14(1):29-37.

Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*. 1999; 122 ( Pt 8):1437-48.

Dehay B, Bové J, Rodríguez-Muela N, *et al*. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease. *J. Neurosci*. 2010; 30:12535–44.

De Lazzari F, Bisaglia M. DJ-1 as a deglycating enzyme: A unique function to explain a multifaceted protein? *Neural Regen Res*. 2017; 12(11):1797-98.

de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006; 5(6): 525–35.

de Rijk MC, Launer LJ, Berger K, *et al*. Prevalence of Parkinson's disease in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000; 54(11 Suppl 5):21–23.

Derivery E, Sousa C, Gautier JJ, *et al*. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell*. 2009; 17(5):712-23.

Desplats P, Lee H-J, Bae E-J, *et al*. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of  $\alpha$ -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2009; 106(31):13010-15.

Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, *et al*. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J. Biol. Chem*. 2008; 283:9089–100.

Dhungel N, Eleuteri S, Li LB, *et al*. Parkinson's disease genes VPS35 and EIF4G1 interact genetically and converge on  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*. 2015; 85(1):76-87.

Dickson DW, Braak H, Duda JE, *et al*. Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*. 2009; 8(12):1150-7.

Di Fonzo A, Dekker MC, Montagna P, *et al*. FBOX7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*. 2009; 72(3):240-5.

Di Maio R, Barrett PJ, Hoffman EK, *et al*.  $\alpha$ -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. *Sci Transl Med*. 2016; 8(342):342ra78.

- Djarmati A, Hedrich K, Svetel M, *et al.* Detection of Parkin (PARK2) and DJ1 (PARK7) mutations in early-onset Parkinson disease: Parkin mutation frequency depends on ethnic origin of patients. *Hum Mutat.* 2004; 23(5):525.
- Ehringer H, Hornykiewicz O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr.* 1960; 38:1236-39.
- Emmanouilidou E, Stefanis L, Vekrellis K. Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol. Aging.* 2010; 31:953-68.
- Farrer M, Chan P, Chen R, *et al.* Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol.* 2001; 50(3):293-300.
- Fava VM, Manry J, Cobat A, *et al.* A Missense LRRK2 Variant Is a Risk Factor for Excessive Inflammatory Responses in Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(2):e0004412.
- Fearnley JM, Lees AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain.* 1991; 114:2283-301.
- Ferese R, Modugno N, Campopiano R, *et al.* Four Copies of SNCA Responsible for Autosomal Dominant Parkinson's Disease in Two Italian Siblings. *Parkinsons Dis.* 2015; 2015:546462.
- Frankel JP, Lees AJ, Kempster PA, Stern GM. Subcutaneous apomorphine in the treatment of Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1990; 53:96-101.
- Fumimura Y, Ikemura M, Saito Y, *et al.* Analysis of the adrenal gland is useful for evaluating pathology of the peripheral autonomic nervous system in Lewy body disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007; 66:354-62.
- Gadhav K, Bolshette N, Ahire A, *et al.* The ubiquitin proteasomal system: a potential target for the management of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2016; 20(7):1392-407.
- Gao HM, Kotzbauer PT, Uryu K, *et al.* Neuroinflammation and oxidation/ nitration of alpha-synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *J. Neurosci.* 2008; 28:7687-98.
- Garnett ES, Firnau G, Nahmias C. Dopamine visualized in the basal ganglia of living man. *Nature.* 1983; 305:137-8.
- Gasser T. Usefulness of Genetic Testing in PD and PD Trials: A Balanced Review. *J Parkinsons Dis.* 2015; 5(2):209-215.
- George S, Brundin P. Immunotherapy in Parkinson's disease: micromanaging alpha-synuclein aggregation. *J. Parkinsons Dis.* 2015; 5:413-24.
- Ghosh D, Mondal M, Mohite GM, *et al.* The Parkinson's disease-associated H50Q mutation accelerates  $\alpha$ -Synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry.* 2013; 52(40):6925-7.
- Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, *et al.* Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov. Disord.* 2008; 23:2129-70.
- Gokool S, Tattersall D, Reddy JV, Seaman MN. Identification of a conserved motif required

for Vps35p/Vps26p interaction and assembly of the retromer complex. *Biochem J.* 2007; 408(2):287-95.

Gómez-Suaga P, Luzón-Toro B, Churamani D, *et al.* Leucine-rich repeat kinase 2 regulates autophagy through a calcium-dependent pathway involving NAADP. *Hum Mol Genet.* 2012; 21(3):511-25.

Gong B, Cao Z, Zheng P, *et al.* Ubiquitin hydrolase Uch-L1 rescues beta-amyloid-induced decreases in synaptic function and contextual memory. *Cell.* 2006; 126(4):775-88.

Gordon PH, Mehal JM, Holman RC, *et al.* Parkinson's disease among American Indians and Alaska natives: a nationwide prevalence study. *Mov Disord.* 2012; 27: 1456–59.

Halperin A, Elstein D, Zimran A. Increased incidence of Parkinson disease among relatives of patients with Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.* 2006; 36(3):426-8.

Hasegawa K, Stoessl AJ, Yokoyama T, *et al.* Familial Parkinsonism: Study of Original Sagami-hara PARK8 (I2020T) Kindred With Variable Clinicopathologic Outcomes. *Parkinsonism & related disorders.* 2009; 15(4):300-6.

Hattori N, Shimura H, Kubo S, *et al.* Importance of familial Parkinson's disease and parkinsonism to the understanding of nigral degeneration in sporadic Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2000; (60):101-16.

Hauser RA, Olanow CW, Dzyngel B, *et al.* Sublingual apomorphine (APL-130277) for the acute conversion of OFF to ON in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2016; 31:1366–72.

Healy DG, Abou-Sleiman PM, Wood NW. Genetic causes of Parkinson's disease: UCHL-1. *Cell Tissue Res.* 2004; 318(1):189-94.

Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, *et al.* Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol.* 2008; 7(7):583-90.

Hernandez DG, Reed X, Singleton AB. Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *J Neurochem.* 2016; 139(Suppl 1):59-74.

Hierro A, Rojas AL, Rojas R, *et al.* Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature.* 2007; 449(7165):1063-7.

Hirsch L, Jette N, Frolkis A, *et al.* The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology.* 2016; 46(4):292-300.

Horowitz M, Wilder S, Horowitz Z, *et al.* The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics.* 1989; 4(1):87-96.

Högl B, Stefani A, Videnovic A. Idiopathic REM sleep behaviour disorder and neurodegeneration - an update. *Nat Rev Neurol.* 2018; 14(1):40-55.

Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat.* 2008; 29(5):567-83.

- 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; 55:181–184.
- Ibáñez P1, Lesage S, Janin S, *et al*. Alpha-synuclein gene rearrangements in dominantly inherited parkinsonism: frequency, phenotype, and mechanisms. *Arch Neurol*. 2009; 66(1):102-8.
- Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, *et al*. Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008; 67:945–53.
- Ito N, Hendriks WT, Dhakal J, *et al*. Decreased N-TAF1 expression in X-linked dystonia-parkinsonism patient-specific neural stem cells. *Dis Model Mech*. 2016; 9(4):451–462.
- Järvelä JT, Rinne JO, Eskola O, Kaasinen V. Mortality in Parkinson's disease is not associated with the severity of early dopaminergic defect. *Parkinsonism Relat Disord*. 2014; 20(8):894-97.
- Katzenschlager R, Hughes A, Evans A, *et al*. Continuous subcutaneous apomorphine therapy improves dyskinesias in Parkinson's disease: a prospective study using single-dose challenges. *Mov. Disord*. 2005; 20:151–7.
- Kaushik S, Cuervo AM. Proteostasis and aging. *Nat Med*. 2015; 21:1406–15.
- Kim E, Lee Y, Lee HJ, *et al*. Implication of mouse Vps26b-Vps29-Vps35 retromer complex in sortilin trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 403(2):167-71.
- Kim HT, Goldberg AL. The deubiquitinating enzyme Usp14 allosterically inhibits multiple proteasomal activities and ubiquitin-independent proteolysis. *J Biol Chem*. 2017; 292(23):9830-9.
- Klein C, Westenberger A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(1):a008888.
- Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, *et al*. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol*. 2007; 6(7):652-62.
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, *et al*. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*. 1998; 18(2):106-8.
- Kuhn AA, Kupsch A, Schneider GH, Brown P. Reduction in subthalamic 8–35 Hz oscillatory activity correlates with clinical improvement in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci*. 2006; 23:1956–60.
- Kühn AA, Kempf F, Brücke C, *et al*. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus suppresses oscillatory beta activity in patients with Parkinson's disease in parallel with improvement in motor performance. *J. Neurosci*. 2008; 28:6165–73.
- Kumazawa R, Tomiyama H, Li Y, *et al*. Mutation analysis of the PINK1 gene in 391 patients with Parkinson disease. *Arch Neurol*. 2008; 65(6):802-8.
- Lai BCL. Epidemiology of Parkinson's disease. *BCM J*. 2001; 43(3):133-7.

- Laitinen LV, Bergenheim AT, Hariz MI. Leksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. *J. Neurosurg.* 1992; 76:53–61.
- Lee LV, Munoz EL, Tan KT, Reyes MT. Sex linked recessive dystonia parkinsonism of Panay, Philippines (XDP). *Molecular Pathology.* 2001; 54(6):362-8.
- Lee PC, Liu LL, Sun Y, *et al.* Traffic-related air pollution increased the risk of Parkinson's disease in Taiwan: a nationwide study. *Environ Int.* 2016; 96:75–81.
- Lee YC, Hsu SD. Familial Mutations and Post-translational Modifications of UCH-L1 in Parkinson's Disease and Neurodegenerative Disorders. *Curr Protein Pept Sci.* 2017; 18(7):733-45.
- Lees AJ, Selikhova M, Andrade LA, Duyckaerts C. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov Disord.* 2008; 23(6):777-83.
- Leroy E, Boyer R, Auburger G, *et al.* The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature.* 1998; 395(6701):451-2.
- Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(R1):R48-59.
- Lesage S, Anheim M, Condroyer C, *et al.* Large-scale screening of the Gaucher's disease-related glucocerebrosidase gene in Europeans with Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2011; 20(1):202-10.
- Lesage S, Anheim M, Letournel F, *et al.* G51D  $\alpha$ -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol.* 2013; 73(4):459-71.
- Lewis PA, Manzoni C. LRRK2 and human disease: a complicated question or a question of complexes? *Sci Signal.* 2012; 5(207):pe2.
- Lilienfeld DE, Chan E, Ehland J, *et al.* Two Decades of Increasing Mortality From Parkinson's Disease Among the US Elderly. *Arch Neurol.* 1990; 47(7):731-4.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, *et al.* Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet.* 1995; 345:91–5.
- Litvan I, MacIntyre A, Goetz CG, *et al.* Accuracy of the clinical diagnoses of Lewy body disease, Parkinson disease, and dementia with Lewy bodies: a clinicopathologic study. *Arch Neurol.* 1998; 55:969–78.
- Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, *et al.* The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell.* 2002; 111(2):209-18.
- Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, *et al.* How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol.* 2003; 54(2):176-85.
- Lücking CB, Brice A. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57(13-14):1894-908.
- Mahlknecht P, Seppi K, Poewe W. The concept of prodromal Parkinson's disease. *J. Parkinsons Dis.* 2015; 5:681–97.

- Marder K, Wang Y, Alcalay RN, *et al.* Age-specific penetrance of LRRK2 G2019S in the Michael J. Fox Ashkenazi Jewish LRRK2 Consortium. *Neurology*. 2015; 85(1):89-95.
- Mata IF, Hutter CM, Gonzalez-Fernandez MC, *et al.* Lrrk2 R1441G-related Parkinson's disease: evidence of a common founding event in the seventh century in Northern Spain. *Neurogenetics*. 2009; 10:347–53.
- McGough IJ, Steinberg F, Jia D, *et al.* Retromer binding to FAM21 and the WASH complex is perturbed by the Parkinson disease-linked VPS35(D620N) mutation. *Curr Biol*. 2014; 24(14):1670-6.
- McNeill A, Duran R, Hughes DA, *et al.* A clinical and family history study of Parkinson's disease in heterozygous glucocerebrosidase mutation carriers. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012; 83(8):853-4.
- McNeill A, Duran R, Proukakis C, *et al.* Hyposmia and cognitive impairment in Gaucher disease patients and carriers. *Mov Disord*. 2012; 27(4):526-32.
- Migdalska-Richards A, Schapira AH. The relationship between glucocerebrosidase mutations and Parkinson disease. *J Neurochem*. 2016; 139(Suppl 1):77-90.
- Miller DW, Hague SM, Clarimon J, *et al.* Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology*. 2004; 62(10):1835-8.
- Monfregola J, Napolitano G, D'Urso M, *et al.* Functional characterization of Wiskott-Aldrich syndrome protein and scar homolog (WASH), a bi-modular nucleation-promoting factor able to interact with biogenesis of lysosome-related organelle subunit 2 (BLOS2) and gamma-tubulin. *J Biol Chem*. 2010; 285(22):16951-7.
- Montagu KA. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature*. 1957; 180(4579):244-45.
- Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, *et al.* Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron*. 2009; 62:218–29.
- Muller T. Catechol-O-methyltransferase inhibitors in Parkinson's disease. *Drugs*. 2015; 75:157–74.
- Mullin S, Schapira AH. Pathogenic mechanisms of neurodegeneration in Parkinson disease. *Neurol Clin*. 2015; 33(1):1-17.
- Munsie LN, Milnerwood AJ, Seibler P, *et al.* Retromer-dependent neurotransmitter receptor trafficking to synapses is altered by the Parkinson's disease VPS35 mutation p.D620N. *Hum Mol Genet*. 2015; 24(6):1691-703.
- Nazé P, Vuillaume I, Destée A, *et al.* Mutation analysis and association studies of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Huntington's disease. *Neurosci Lett*. 2002; 328(1):1-4.
- Odekerken VJ, van Laar T, Staal MJ, *et al.* Subthalamic nucleus versus globus pallidus bilateral deep brain stimulation for advanced Parkinson's disease (NSTAPS study): a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2013; 12:37–44.

- Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, *et al.* Axonal alpha-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain*. 2008; 131:642–50.
- Orr-Urtreger A, Shifrin C, Rozovski U, *et al.* The LRRK2 G2019S mutation in Ashkenazi Jews with Parkinson disease: is there a gender effect? *Neurology*. 2007; 69:1595-602.
- Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, *et al.* Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*. 2004; 44(4):595-600.
- Paisan-Ruíz C, Bhatia KP, Li A, *et al.* Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol*. 2009; 65(1):19-23.
- Paisán-Ruíz C, Lewis PA, Singleton AB. LRRK2: cause, risk, and mechanism. *J Parkinsons Dis*. 2013; 3(2):85-103.
- Palacios N. Air pollution and Parkinson's disease - evidence and future directions. *Rev Environ Health*. 2017; 32(4):303-13.
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2002; 14: 223–36. discussion 2.
- Phillips NJ, Reay J, Martyn CN. Validity of mortality data for Parkinson's disease. *J Epidemiol Community Health*. 1999; 53:587-8.
- Picconi B, Hernández LF, Obeso JA, Calabresi P. Motor complications in Parkinson's disease: Striatal molecular and electrophysiological mechanisms of dyskinesias. *Mov Disord*. 2017; doi: 10.1002/mds.27261.
- Pissadaki EK, Bolam JP. The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease. *Front. Comput. Neurosci*. 2013; 7:13.
- Poewe W, Antonini A. Novel formulations and modes of delivery of levodopa. *Mov. Disord*. 2015; 30:114–20.
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, *et al.* Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*. 1996; 274(5290):1197-9.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997; 276(5321):2045-7.
- Postuma RB, Berg D, Stern M, *et al.* MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015; 30(12):1591-601.
- Ragland M, Hutter C, Zabetian C, Edwards K. Association between the ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 gene (UCHL1) S18Y variant and Parkinson's Disease: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2009; 170(11):1344-57.
- Rajput AH, Rozdilsky B, Rajput A. Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism: a prospective study. *Can J Neurol Sci*. 1991; 18:275–8.
- Ramirez A, Heimbach A, Gründemann J, *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):1184-91.



- Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016; 353:777–83.
- Reczek D, Schwake M, Schroder J, *et al*. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell*. 2007; 131:770-83.
- Richarme G, Mihoub M, Dairou J, *et al*. Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 is a major protein deglycase that repairs methylglyoxal- and glyoxal-glycated cysteine, arginine, and lysine residues. *J Biol Chem*. 2015; 290(3):1885-97.
- Rodrigues e Silva AM, Geldsetzer F, Holdorff B, *et al*. Who was the man who discovered the “Lewy bodies”? *Mov Disord*. 2010; 25:1765-73.
- Rojas R, van Vlijmen T, Mardones GA, *et al*. Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol*. 2008; 183(3):513-26.
- Ruck A, Attonito J, Garces KT, *et al*. The Atg6/Vps30/Bec1 1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy*. 2011; 7(4):386-400.
- Ruiz-Martínez J, Gorostidi A, Ibañez B, *et al*. Penetrance in Parkinson's disease related to the LRRK2 R1441G mutation in the Basque country (Spain). *Mov Disord*. 2010; 25(14):2340-5.
- Sakaue S, Takashi Kasai T, Mizuta I, *et al*. Early-onset parkinsonism in a pedigree with phosphoglycerate kinase deficiency and a heterozygous carrier: do *PGK-1* mutations contribute to vulnerability to parkinsonism? *NPJ Parkinsons Dis*. 2017; 3:13.
- Samaranch L, Lorenzo-Betancor O, Arbelo JM, *et al*. PINK1-linked parkinsonism is associated with Lewy body pathology. *Brain*. 2010; 133(Pt 4):1128-42.
- Sampson TR, Debelius JW, Thron T, *et al*. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease. *Cell*. 2016; 167:1469–80.
- Santos-García D, Suárez-Castro E, Hernandez J, *et al*. Predictors of Mortality in Nondemented Patients With Parkinson Disease: Motor Symptoms Versus Nonmotor Symptoms. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. 2018; 31(1):19-26.
- Savica R, Grossardt BR, Bower JH, *et al*. Time trends in the incidence of Parkinson disease. *JAMA Neurol*. 2016; 73(8):981–9.
- Schapira AH, Tolosa E. Molecular and clinical prodrome of Parkinson disease: implications for treatment. *Nat Rev Neurol*. 2010; 6(6):309-17.
- Schapira AH, Fox SH, Hauser RA, *et al*. Assessment of safety and efficacy of safinamide as a levodopa adjunct in patients with Parkinson disease and motor fluctuations: a randomized clinical trial. *JAMA Neurol*. 2017; 74, 216–24.
- Scott WK, Yamaoka LH, Stajich JM, *et al*. The alpha-synuclein gene is not a major risk factor in familial Parkinson disease. *Neurogenetics*. 1999; 2(3):191-2.
- Seaman MN. The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci*. 2012; 125(Pt 20):4693-702.
- Seaman MN, Gautreau A, Billadeau DD. Retromer-mediated endosomal protein sorting: all

WASHed up! *Trends Cell Biol.* 2013; 23(11):522-8.

Selikhova M, Fedoryshyn L, Matviyenko Y, *et al.* Parkinsonism and dystonia caused by the illicit use of ephedrine - A longitudinal study. *Mov Disord.* 2008; 23(15):2224-31.

Siddiqui IJ, Pervaiz N, Abbasi AA. The Parkinson Disease gene SNCA: Evolutionary and structural insights with pathological implication. *Sci Rep.* 2016; 6:24475.

Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, *et al.* Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2009; 361(17):1651-61.

Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, *et al.* Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet.* 2009; 41(12):1308-12.

Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord.* 2013; 28(1):14-23.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, *et al.* Alpha synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997; 388:839-40.

Surmeier DJ, Schumacker PT, Guzman JD, *et al.* Calcium and Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017; 483:1013-9.

Swanson CR, Berlyand Y, Xie SX, *et al.* Plasma apolipoprotein A1 associates with age at onset and motor severity in early Parkinson's disease patients. *Mov Disord.* 2015; 30:1648-56.

Taipa R, Pereira C, Reis I, *et al.* DJ-1 linked parkinsonism (PARK7) is associated with Lewy body pathology. *Brain.* 2016; 139(Pt 6):1680-7.

Tarakad A, Jankovic J. Anosmia and Ageusia in Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol.* 2017; 133:541-56.

Trinh J, Guella I, Farrer MJ. Disease penetrance of late-onset parkinsonism: a meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2014a; 71(12):1535-9.

Trinh J, Gustavsson EK, Guella I, *et al.* The role of SNCA and MAPT in Parkinson disease and LRRK2 parkinsonism in the Tunisian Arab-Berber population. *Eur J Neurol.* 2014b; 21(11):e91-2.

Tyson T, Steiner JA, Brundin P. Sorting out release, uptake and processing of alpha-synuclein during prion-like spread of pathology. *J. Neurochem.* 2016; 139 (Suppl. 1):275-89.

Villar-Piqué A, Rossetti G, Ventura S, *et al.* Copper(II) and the pathological H50Q  $\alpha$ -synuclein mutant: Environment meets genetics. *Commun Integr Biol.* 2017; 10(1):e1270484.

Violante-Rodriguez M, Cervantes-Arriaga A, Fahn S, Tolosa E. Two-hundred years later: Is Parkinson's disease a single defined entity? *Rev Inves Clin.* 2017; 69: 308-13.

Volta M, Milnerwood AJ, Farrer MJ. Insights from late-onset familial parkinsonism on the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2015; 14(10):1054-64.

- von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, *et al.* Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2005; 15(4):473–90.
- Wang JD, Huang CC, Hwang YH, *et al.* Manganese induced parkinsonism: an outbreak due to an unrepaired ventilation control system in a ferromanganese smelter. *Br J Ind Med.* 1989 ; 46(12):856-9.
- Wang Y. The incidence and prevalence of Parkinson's disease in the People's Republic of China. Chung-Hua Liu Hsing Ping Hsueh Tsa Chih *Chinese J Epidemiol.* 1991; 12:363-5.
- Wang W, Wang X, Fujioka H, *et al.* Parkinson's disease-associated mutant VPS35 causes mitochondrial dysfunction by recycling DLP1 complexes. *Nat Med.* 2016; 22(1):54-63.
- Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, *et al.* The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science.* 1989 Nov; 246(4930):670-3.
- Williams DR, Hadeed A, al-Din AS, *et al.* Kufor Rakeb disease: autosomal recessive, levodopa-responsive parkinsonism with pyramidal degeneration, supranuclear gaze palsy, and dementia. *Mov Disord.* 2005; 20(10):1264-71.
- Williams ET, Chen X, Moore DJ. VPS35, the Retromer Complex and Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis.* 2017;7(2):219-33.
- Williams-Gray CH, Mason SL, Evans JR, *et al.* The CamPaIGN study of Parkinson's disease: 10-year outlook in an incident population-based cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2013; 84(11):1258-64.
- Wilson GR, Sim JC, McLean C, *et al.* Mutations in RAB39B cause X-linked intellectual disability and early-onset Parkinson disease with  $\alpha$ -synuclein pathology. *Am J Hum Genet.* 2014;95(6):729-35.
- Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, *et al.* Alpha-synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J. Cell Biol.* 2010; 190:1023–37.
- Wintermeyer P, Krüger R, Kuhn W, *et al.* Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients. *Neuroreport.* 2000; 11(10):2079-82.
- Writing Group for the NINDS Exploratory Trials in Parkinson Disease (NET-PD) Investigators, Kieburtz K, Tilley BC, Elm JJ, Babcock D, *et al.* Effect of creatine monohydrate on clinical progression in patients with Parkinson disease: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2015; 313(6):584-93.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, *et al.* The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 2004; 55(2):164-73.
- Zhang M, Cai F, Zhang S, *et al.* Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) delays Alzheimer's progression *in vivo*. *Sci Rep.* 2014; 4:7298.
- Zimprich A, Biskup S, Leitner P, *et al.* Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron.* 2004; 44(4):601-7.
- Yan C, Huo H, Yang C, *et al.* Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1 regulates autophagy by inhibiting autophagosome formation through its deubiquitinating enzyme activity. *Biochem*

*Biophys Res Commun.* 2018; 497(2):726-33.

Xilouri M, Brekk OR, Stefanis L. Alpha-synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Mol. Neurobiol.* 2013; 47:537–51.

Xilouri M, Vogiatzi T, Vekrellis K, *et al.* Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. *PLoS ONE.* 2009; 4:e5515.

**Apendix 1 / Odstupňovanie („staging“) mozgovej patológie typickej pre idiopatickú (sporadickú) formu PD podľa Braak *et al.*, 2003**

Štádium podľa Braaka	Postihnutá oblasť
1 a 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kaudálne rafeálne jadrá</li> <li>• retikulárna formácia</li> </ul>
3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• motorické jadrá IX. a X. hlavového nervu</li> <li>• melanínové neuróny <i>substantia nigra</i></li> <li>• neokortex</li> </ul>
4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>substantia nigra pars compacta</i></li> <li>• mezencefalon</li> <li>• talamus</li> <li>• hypotalamus</li> <li>• <i>nucleus olfactorius anterior</i></li> <li>• temporálny mezokortex</li> </ul>
5	<ul style="list-style-type: none"> <li>• šírenie do neokortexu</li> </ul>
6	<ul style="list-style-type: none"> <li>• takmer celý neokortex</li> </ul>

## **Apendix 2 / Nigrálne a extranigrálne príznaky PD**

<b>nigrálne príznaky</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• rigidita bradykinéza</li><li>• tremor</li></ul>
<b>extranigrálne príznaky</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• kognitívny deficit</li><li>• poruchy nálady</li><li>• ortostáza</li><li>• zápcha</li><li>• poruchy močenia</li><li>• erektilná dysfunkcia</li><li>• poruchy čuchu</li><li>• bolesti</li><li>• poruchy spánku</li></ul>

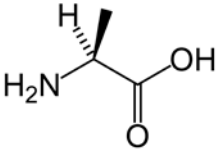
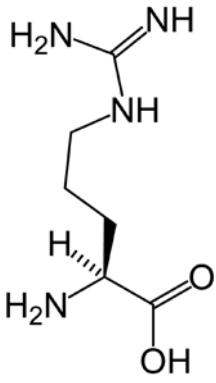
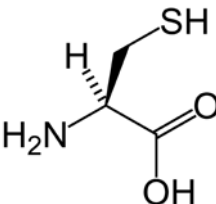
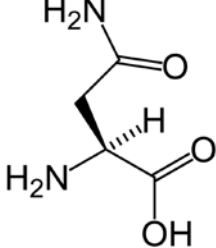
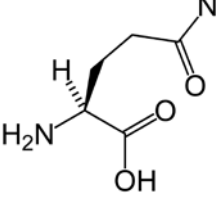
**Apendix 3 / Motorické, neuropsychiatrické a autonómne a senzitivne komplikácie súvisiace s PD, alebo liečbou ochorenia**

motorické komplikácie	fluktuácie	bez súvisu s liečbou	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>kinesia paradoxa</i></li> <li>• „freezing“ (prechodná neschopnosť pohnúť sa)</li> <li>• „sleep benefit“ (prechodné zlepšenie, obvyčajne mobility, po spánkovej fáze cirkadiálneho rytmu)</li> </ul>
		závislé na dopamínergnej terapii	<ul style="list-style-type: none"> <li>• „wearing off“ (odzníevanie)</li> <li>• iniciálne zhoršenie</li> <li>• intermitentná neúčinnosť</li> <li>• neúplný účinok</li> <li>• chaotický „on-off“ fenomén (výrazná chaotická oscilácia diskínézie-akinézie)</li> </ul>
	dyskinézie	bez súvisu s liečbou	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fokálna dystónia</li> <li>• myoklonus</li> <li>• akatízia</li> <li>• RLS („Restless Legs Syndrome“)</li> <li>• RBD („REM Sleep Behaviour Disorder“)</li> </ul>
		závislé na dopamínergnej liečbe	<ul style="list-style-type: none"> <li>• „Peak-dose“ monofázické</li> <li>• „End-of-dose“ bifázické</li> <li>• „Off“ dystónia</li> </ul>

<b>neuropsychiatrické komplikácie</b>	<b>bez súvisu s liečbou</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• depresia</li> <li>• úzkosť a panika</li> <li>• kognitívna porucha a demencia</li> <li>• poruchy spánku</li> <li>• apatia</li> <li>• únava</li> </ul>
	<b>závislé na dopamínergnej liečbe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• halucinácie a delírium</li> <li>• psychóza</li> <li>• afektívne „on-off“ zmeny</li> <li>• sedácia</li> <li>• kompulzie a repetitívna činnosť</li> </ul>
<b>autonómne a senzitívne komplikácie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kožné zmeny</li> <li>• obštipácia</li> <li>• ortostatická hypotenzia</li> <li>• hyperaktivita močového mechúra</li> <li>• úbytok hmotnosti</li> <li>• bolesť</li> </ul>	



**Appendix 4 / Tabuľka 1: Aminokyseliny (A)**

Aminokyselina	<sup>1</sup> Skratka	<sup>2</sup> Skratka	Aminokyselina	<sup>1</sup> Skratka	<sup>2</sup> Skratka
Alanín 	Ala	A	Asn + Asp	Asx	B
Arginín 	Arg	R	Cysteín 	Cys	C
Asparagín 	Asn	N	Glutamín 	Gln	Q
kyselina asparágová	Asp	D	Kyselina glutamová	Glu	E

--	--	--	--	--	--

Postranný reťazec:

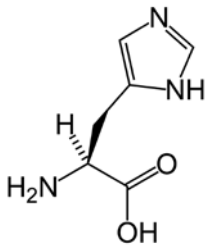
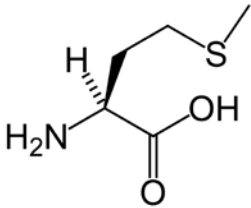
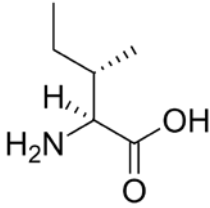
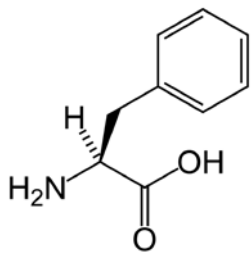
hydrofóbny	hydrofilný	bázický	kyslý
------------	------------	---------	-------

<sup>1</sup> trojpísmenová skratka

<sup>2</sup> jednopísmenová skratka

#### Appendix 4 / Tabuľka 1: Aminokyseliny (B)

Aminokyselina	<sup>1</sup> Skratka	<sup>2</sup> Skratka	Aminokyselina	<sup>1</sup> Skratka	<sup>2</sup> Skratka
Gln + Glu	Glx	Z	Leucín	Leu	L
Glycín	Gly	G	Lyzín	Lys	K

Histidín 	His	H	Metionín 	Met	M
Izoleucín 	Ile	I	Fenylalanín 	Phe	F

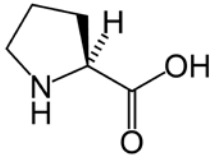
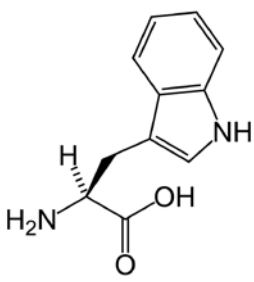
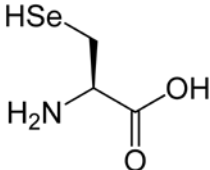
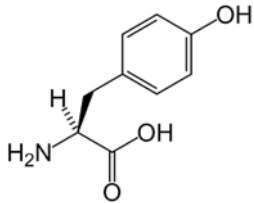
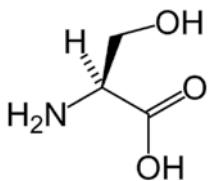
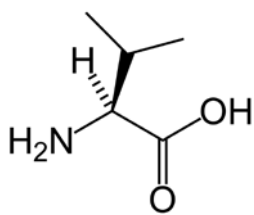
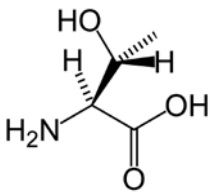
Postranný reťazec:

hydrofóbny	hydrofilný	bázický	kyslý
------------	------------	---------	-------

<sup>1</sup> trojpísmenová skratka

<sup>2</sup> jednopísmenová skratka

# Appendix 4 / Tabuľka 1: Aminokyseliny (C)

Aminokyselina	<sup>1</sup> Skratka	<sup>2</sup> Skratka	Aminokyselina	<sup>1</sup> Skratka	<sup>2</sup> Skratka
Prolín 	Pro	P	Tryptofán 	Trp	W
Selenocysteín 	Sec	U	Tyrozín 	Tyr	Y
Serín 	Ser	S	Valín 	Val	V
Treonín 	Thr	T			

Postranný reťazec:

hydrofóbny	hydrofilný	bázický	kyslý
------------	------------	---------	-------

<sup>1</sup> trojpísmenová skratka

<sup>2</sup> jednopísmenová skratka

## **Apendix 5 / Stručné pravidlá popisu sekvenčných variant podľa HGVS (Human Genome Variation Society) 2016**

1. názvy génov musia byť oficiálne v súlade s HGNC (Human Genom Nomenclature Committee) odporúčaniami.
2. Všetky novoopísané zmeny musia byť uvedené v prvom rade na úrovni DNA aj v prípade, že primárne hovoríme o zmene na úrovni RNA, alebo proteínu. Príklad: c.78G>T (r.78g>u, p.Trp26Cys).
  - c. kódujúca DNA sekvencia (c.76A>T)
  - g. genomická DNA sekvencia (g.476A>T)
  - m. mitochondriálna DNA sekvencia (m. 8993T>C)
  - n. nekódujúca RNA sekvencia
  - r. RNA sekvencia (r.76a>u)
  - p. sekvencia proteínu (p.Lys76Asn)
3. Pre odlíšenie zápisu sú zmeny na úrovni DNA zapisované veľkými písmenami, pričom zápis začína číslom udávajúcim pozíciu prvého pozmeneného nukleotidu (c.76A>T, alebo g.476A>T)
4. Pre odlíšenie zápisu sú zmeny na úrovni RNA zapisované malými písmenami, pričom zápis začína číslom udávajúcim pozíciu prvého pozmeneného nukleotidu (c.76A>T, alebo g.476A>T)
5. Pre odlíšenie zápisu sú zmeny na úrovni proteínu udávané trojpísmenovou skratkou aminokyseliny, pričom zápis začína trojpísmenovou skratkou aminokyseliny pred zmenou nasledovanou číslom udávajúcim jej pozíciu a skratkou aminokyseliny, ktorá ju v danej pozícii nahradila (p.Lys76Asn)
6. Číslovanie nukleotidov pre kódujúce DNA referenčné sekvencie má pevné pravidlá:
  - neexistuje nukleotid 0
  - nukleotid +1 je A v iniciačnom kodóne ATG
  - prvý 5' nukleotid pred iniciačným kodónom kódujúcej sekvencie je -1, druhý -2 atď.
  - prvý 3' nukleotid za stop kodónom kódujúcej sekvencie je \*1, druhý \*2 atď.
  - Pre intrónové nukleotidy sa pozícia udáva vo forme:
    - ❖ v prípade, že ide o začiatok intrónu, číslo posledného nukleotidu predchádzajúceho exónu nasledované znamienkom + a pozíciou nukleotidu v danom intróne (počítané po smere zápisu čítacieho rámca; c.77+1G, alebo c.77+2T)

- ❖ v prípade, že ide o koniec intrónu, číslo prvého nukleotidu nasledujúceho exónu nasledované znamienkom - a pozíciou nukleotidu v danom intróne (počítané proti smeru zápisu čítacieho rámca; c.78-1G)

7. Znaký vyjadrujúce špecifické zmeny:

- > označuje substitúciu na úrovni nukleovej kyseliny (c.76A>T)
- \_ označuje rozsah zmenou zasiahnutých rezíduí (c.76\_78delACT)
- del označuje deléciu c.76delA
- dup označuje duplikáciu c.76dupA
- ins označuje inzerciu c.76\_77insG
- inv označuje inverziu c.76\_83inv
- con označuje converziu c.123\_678conNM\_004006.1:c.123\_678
- [ ] označuje alelu c.[76A>T]
- ( ) označuje pozične presne nešpecifikovanú zmenu v odhadovanom sekvenčnom pásme c.(67-70)insG