

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



Genetika a fenotypová charakteristika Parkinsonovy nemoci s časným začátkem

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

**MUDr. Ondřej Fiala**

2014

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Neurovědy

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Karel Šonka, DrSc.

Školící pracoviště: Neurologická klinika, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze

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

Konzultant: prof. MUDr. Pavel Martásek, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Obsah

1.	Abstrakt .....	4
2.	Abstract .....	5
3.	Úvod .....	6
3.1.	Parkinsonova nemoc a její patogeneze .....	6
3.2.	Genetika Parkinsonovy nemoci .....	6
3.3.	Výzkumné přístupy k hledání genetických změn u Parkinsonovy nemoci .....	7
3.4.	Parkinsonova nemoc s časným začátkem .....	8
3.5.	PARK2 - parkin .....	8
4.	Cíle a hypotézy .....	10
5.	Metodika .....	10
5.1.	Pacienti a kontroly .....	10
5.2.	Genetické analýzy .....	11
5.2.1.	Izolace DNA .....	11
5.2.2.	Analýza genetických změn <i>parkinu</i> u pacientů .....	11
5.2.3.	Analýza genetických změn <i>parkinu</i> u kontrol .....	11
5.2.4.	Analýza exonových delecí a multiplikací <i>parkinu</i> u pacientů a kontrol .....	11
5.2.5.	Klasifikace, patogenita a frekvence genetických změn <i>parkinu</i> .....	12
5.3.	Statistická analýza .....	12
6.	Výsledky .....	12
6.1.	Fenotypová charakteristika pacientů .....	12
6.1.1.	Začátek, trvání, tíže a rodinný výskyt onemocnění .....	12
6.1.2.	Motorické příznaky .....	12
6.1.3.	Non-motorické příznaky .....	13
6.1.4.	Komplikace, fluktuace hybnosti, polékové dyskineze a léčba .....	13
6.2.	Rizikové faktory u pacientů a kontrol .....	13
6.3.	Alelické varianty <i>parkinu</i> u pacientů a kontrol .....	14
6.4.	Testování hypotéz .....	14
7.	Diskuse .....	16
7.1.	Fenotyp .....	16
7.1.1.	Začátek onemocnění, diagnóza .....	16
7.1.2.	Motorické příznaky .....	17
7.1.3.	Non-motorické příznaky .....	18
7.1.4.	Komplikace, fluktuace hybnosti a polékové dyskineze .....	19
7.1.5.	Léčba .....	19
7.2.	Rizikové faktory .....	19
7.3.	Genotyp .....	20
7.3.1.	Polymorfismy .....	20
7.3.2.	Vzácné alelické varianty .....	20
7.3.3.	Mutace .....	21
7.3.4.	Rozdíly v prevalenci alelických změn <i>parkinu</i> u pacientů a kontrol .....	22
7.4.	Soubor pacientů a statistická analýza .....	22
8.	Závěr .....	23
9.	Literatura .....	24
10.	Seznam publikací doktoranda: .....	28

## 1. Abstrakt

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

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

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

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

## **2. Abstract**

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

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

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

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

### **3. Úvod**

#### **3.1. Parkinsonova nemoc a její patogeneze**

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

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

Molekulární patogeneze PN je složitou mozaikou různě významných a vzájemně interagujících patogenních mechanismů. K nejvýznamnějším patří agregace alfa-synukleinu, poruchy odbourávání proteinů v ubikvitin-proteazomovém systému (UPS) a lysozomech, mitochondriální dysfunkce a oxidativní stres, narušení transportu synaptických vezikul, zánětlivá reakce spojená s gliální aktivací, aberantní reaktivace buněčného cyklu či dysregulace apoptózy (Foltynie T. & Kahan J., 2013). Tyto patologické změny vznikají na základě několika primárních příčin. Jsou jimi negativní vlivy vnějšího prostředí (Kiebertz K. & Wunderle K.B., 2013), biologické stárnutí (Douglas P.M. & Dillin A., 2010) a genetické změny (Lubbe S. & Morris H.R., 2014), kterými se blíže zabývá tato práce.

#### **3.2. Genetika Parkinsonovy nemoci**

Zmínky o hereditárních aspektech PN jsou staré více než 100 let. Již Leroux (Leroux P., 1890) a Gowers (Gowers W., 1900) upozorňují na relativně vysoké procento familiárního výskytu PN. Přesto byla PN dlouho považována za výhradně sporadické onemocnění. Přelom ve výzkumu genetiky PN nastal až v 90. letech 20. století. V současné době je známo 19 lokusů a 14 genů, v nichž byly identifikovány mutace zodpovědné za monogenní PN. Tato forma PN je přenášena vždy jen jedním genem a tvoří asi 5 - 10% z celkového počtu onemocnění (Lesage S. & Brice A., 2009). Výskyt PN u několika členů rodiny (< 10% nemocných) svědčí pro možný genetický přenos, nicméně svoji roli mohou sehrát i sdílené vlivy prostředí. Pravděpodobnost záchytu mutace u familiární formy PN je značně vysoká (až 30%), nelze ji však vyloučit ani u sporadických případů (3-5%) (Klein C. & Westenberger A.,

2012). Přítomnost mutace ještě neznamená, že dojde k rozvoji onemocnění. O jejím fenotypovém projevu - penetranci, rozhoduje celá řada proměnných. Některé mutace zasahují do patogeneze v takové míře, že nemoc propukne vždy bez ohledu na okolní vlivy (kompletní penetrance). V jiných případech genetická změna indukuje pouze částečnou odchylku od normy a pro její uplatnění je třeba spolupůsobení dalších faktorů (inkompletní penetrance). Takovým příkladem je věkově vázaná penetrance, kdy se zděděná vloha manifestuje až v přítomnosti patologických změn, hromadících se v průběhu stárnutí.

Genetické změny, které mohou zvyšovat riziko rozvoje PN, ale samy o sobě onemocnění nevyvolávají, označujeme jako polymorfismy (frekvence > 1% populace) a vzácné alelické varianty (frekvence < 1% populace). Na rozdíl od mutací, které působí vznik defektního proteinu a rozvoj onemocnění, polymorfismy a alelické varianty pouze částečně pozměňují funkci bílkoviny, narušují její subcelulární lokalizaci nebo ovlivňují míru exprese.

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

### **3.3. Výzkumné přístupy k hledání genetických změn u Parkinsonovy nemoci**

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

et al., 2014) a mnohem užšího vymezení charakteristiky odpovídajícího fenotypu (Grunewald A. et al., 2013).

### 3.4. Parkinsonova nemoc s časným začátkem

PN začíná nejčastěji mezi 60. - 70. rokem věku (Twelves D. et al., 2003). V anglosaské literatuře bývá pro tuto formu užíváno označení late-onset (PN s pozdním začátkem, dále jen LOPD) a její projevy odpovídají "klasickému" obrazu PN. Asi 3 - 5% nemocných má první příznaky nemoci již před 40. rokem věku (Schrag A. & Schott J.M., 2006). Incidence této vzácné formy PN, zvané early-onset (PN s časným začátkem, dále jen EOPD), je odhadována na 0,5 na 100 000 (Van Den Eeden S.K. et al., 2003). Fenotyp EOPD se od klasické PN do určité míry odlišuje. Pacienti s časným začátkem mají obvykle pomalejší progresi onemocnění, dobrou odpovídatost na dopaminergní terapii a brzký rozvoj polékových dyskinezií. Častá je přítomnost dystonie a zlepšení motorických příznaků po vyspání (tzv. sleep benefit). Kognitivní funkce zůstávají u většiny nemocných dlouhou dobu normální (Schrag A. & Schott J.M., 2006).

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

Nejčastější genetickou změnou asociovanou s EOPD jsou mutace v genu *parkin* (PARK2). Lücking et al. publikoval přítomnost mutací parkinu u 50% familiárních a 18% sporadických forem EOPD (Lücking C.B. et al., 2000). Naopak v jiných studiích byla frekvence patogenních mutací *parkinu* u EOPD podstatně nižší (1,6 - 8,6%) (Brooks J. et al., 2009; Kilariski L.L. et al., 2012; Koziarowski D. et al., 2010). Výrazné rozdíly v prevalenci mutací mezi jednotlivými studiemi jsou pravděpodobně způsobeny populačně specifickou variabilitou četnosti alelických variant *parkinu* (Kilariski L.L. et al., 2012).

### 3.5. PARK2 - parkin

#### Genotyp a fenotyp

V roce 1998 byla u rodiny japonského původu v oblasti lokusu PARK2 nalezena mutace genu kódujícího protein parkin (Kitada T. et al., 1998). Dnes je známo přes 180 mutací *parkinu*, zahrnujících bodové mutace, a dále exonové delece a multiplikace, které tvoří přes 50% všech



patogenních změn *parkinu* (Grunewald A. et al., 2013). Frekvence mutací závisí na formě PN (sporadická x familiární), na populaci (kapitola 1.3.) a na věku při prvních projevech onemocnění (< 20 let - 68%, > 40 let - 9%) (Periquet M. et al., 2003). Výskyt mutací *parkinu* je asociován s AR přenosem EOPD.

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

### **Protein**

Parkin hraje roli v odbourávání proteinů pomocí UPS. Má aktivitu E3 ubikvitin ligázy, enzymu, který váže ubikvitin na bílkoviny určené k degradaci v proteazomu (Shimura H. et al., 2000). Mezi jeho substráty patří např. Pael-R (parkin-associated endothelin receptor-like receptor) (Imai Y. et al., 2001), alfa-synuklein (Shimura H. et al., 2001) a další. Anti-apoptický efekt parkinu byl prokázán jak in vitro, tak in vivo (Cha G.-H. et al., 2005; Machida Y. et al., 2005). Mechanismem, jímž parkin přispívá k inhibici apoptózy, může být např. ubikvitinace substrátu Pael-R, který má schopnost indukovat buněčnou smrt (Kitao Y. et al., 2007). Parkin také zvyšuje transkripční aktivitu NK-κB (nuclear factor kappa B), významného induktoru anti-apoptických genů (Henn I.H. et al., 2007).

Klíčový význam má parkin pro stavbu a funkci mitochondrií. Regulací transkripce a replikace mtDNA (mitochondriální DNA) se podílí na mitochondriální biogenezi, ubikvitinací mitofusinu 1 a 2 ovlivňuje mitochondriální dynamiku (fúzi a štěpení). Zastává také úlohu v transportu mitochondrií a spolu s PINK1 (PARK6) reguluje mitofagii (degradaci dysfunkčních mitochondrií) (Gaweda-Walerych K. & Zekanowski C., 2013). Porucha mitochondriálních funkcí způsobená mutacemi parkinu a PINK1 je jednou ze základních patogenetických hypotéz vzniku EOPD (Pilsal A. & Winklhofer K.F., 2012).

#### 4. Cíle a hypotézy

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

##### **Cíle klinické části:**

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

##### Hypotézy:

- Testovaná H1<sub>0</sub>: fenotyp pacientů s mutacemi a bez mutací *parkinu* se neliší.
  - Alternativní H1<sub>A</sub>: fenotyp pacientů s mutacemi a bez mutací se odlišuje.
2. Porovnat výskyt rizikových faktorů prostředí ve skupině pacientů a zdravých kontrol, stanovit jejich vztah k rozvoji onemocnění.

##### Hypotézy:

- Testovaná H2<sub>0</sub>: mezi nemocnými a kontrolami není rozdíl v přítomnosti rizikových faktorů vnějšího prostředí.
- Alternativní H2<sub>A</sub>: existuje rozdíl mezi výskytem rizikových faktorů vnějšího prostředí u nemocných a kontrol.

##### **Cíle genetické části:**

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

##### Hypotézy:

- Testovaná H3<sub>0</sub>: ve skupině pacientů a kontrol není rozdíl v prevalenci genetických změn *parkinu*.
- Alternativní H3<sub>A</sub>: v prevalenci genetických změn *parkinu* existují mezi pacienty a kontrolami rozdíly.

#### 5. Metodika

##### **5.1. Pacienti a kontroly**

Do studie bylo zařazeno 70 nepřibuzných pacientů (47 mužů a 23 žen) s EOPD (věk při vzniku onemocnění  $\leq 40$  let). Průměrný věk nemocných byl  $47,4 \pm 8,4$  let. Nábor pacientů probíhal v Centru extrapyramidových onemocnění Neurologické kliniky 1. LF UK s VFN v Praze mezi roky 2007 - 2013. Všichni nemocní splňovali diagnostická kritéria PN dle United Kingdom Brain Bank s výjimkou toho, že familiární výskyt PN nebyl pokládán za vylučující kritérium (Hughes A.J. et al., 1992). Kontroly tvořilo 75 zdravých nepřibuzných osob (52 mužů, 23 žen), dobrovolných dárců krve, kteří byli do studie zařazeni v letech 2011 - 2013 z Fakultního transfuzního oddělení VFN v Praze. Průměrný věk kontrol činil  $45,5 \pm 9,2$  let. Písemný informovaný souhlas byl podepsán všemi pacienty a kontrolami. Nemocní i zdraví dobrovolníci byli neurologicky vyšetřeni a byl s nimi vyplněn strukturovaný dotazník,

zahrnující údaje o fenotypu, rizikových faktorech či rodinné anamnéze. Všechny kontroly měly normální neurologické vyšetření a negativní rodinnou anamnézu PN. Za pozitivní rodinnou anamnézu byla považována přítomnost PN alespoň u jednoho příbuzného 1. či 2. stupně. Klinické vyšetření pacientů s EOPD zahrnovalo evaluaci tíže onemocnění (stupnice dle Hoehnové a Yahra, dále jen H-N), zhodnocení kognice (škála MMSE - Mini-Mental State Examination), přítomnost motorických a non-motorických příznaků (škála NMSS - Non-Motor Symptoms Scale), výskyt polékových dyskinezií a pohybových fluktuací (UPDRS IV - Unified Parkinson's Disease Rating Scale). Studie byla schválena etickou komisí VFN.

## **5.2. Genetické analýzy**

### **5.2.1. Izolace DNA**

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

### **5.2.2. Analýza genetických změn *parkinu* u pacientů**

Všech 12 exonů genu *parkin* bylo amplifikováno z genomové DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro PCR jsme použily dříve publikované primery (Kitada T. et al., 1998). PCR produkty jsme sekvenovali v obou směrech sekvenátorem 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Získané chromatogramy byly analyzovány manuálně pomocí softwaru SeqScape v2.5 (Applied Biosystems) nebo Chromas Pro v1.5 (Technelysium).

### **5.2.3. Analýza genetických změn *parkinu* u kontrol**

Genetické změny *parkinu* nalezené u nemocných s EOPD byly u větší části souboru (n=45) identifikovány metodou vysokorozlišovací analýzy křivek tání (HRM - high resolution melt). Reakční mix pro PCR obsahoval stejné primery, jež jsme předtím použili k přípravě produktů pro sekvenování. Výsledné vzorky byly analyzovány pomocí systému LightScanner (BioFire Defence) a získané křivky vyhodnoceny softwarem Call-IT v1.5 (BioFire Defence). U menšího procenta kontrolní skupiny (n=30) jsme použili metodu sekvenování shodnou s postupem uvedeným v odstavci 5.2.2.

### **5.2.4. Analýza exonových delecí a multiplikací *parkinu* u pacientů a kontrol**

K identifikaci exonových delecí a multiplikací *parkinu* jsme použili u pacientů i kontrol techniku MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification; produkt SALSA MLPA, kit P051-C3-0313 a P052-C2-0313, MRC-Holland). Při analýze jsme postupovali dle doporučení výrobce. Výsledné vzorky byly analyzovány přístrojem 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) za použití softwaru Gene Mapper 4.0. Pro interpretaci fragmentů jsme použili program Coffalyser v.131211.

### 5.2.5. Klasifikace, patogenita a frekvence genetických změn *parkinu*

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

### 5.3. Statistická analýza

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

## 6. Výsledky

### 6.1. Fenotypová charakteristika pacientů

#### 6.1.1. Začátek, trvání, tíže a rodinný výskyt onemocnění

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

#### 6.1.2. Motorické příznaky

Téměř u všech pacientů byla přítomna rigidita (97,1%) a bradykineze (95,7%), většina trpěla rovněž třesem (85,7%). Častá byla také porucha chůze (84,3%) s průměrným rozvojem  $5,2 \pm 3,4$  roku od začátku onemocnění. Mikrografií mělo 82,9% nemocných s relativně časným začátkem  $3,9 \pm 4,3$  roku. U 62,1% pacientů se objevil tento příznak před stanovením diagnózy (průměr  $2,2 \pm 3,4$  roky) a u 36,2% nemocných začala mikrografie v těsném intervalu před diagnózou (0 - 12 měsíců). Dysartrie byla přítomna ve dvou třetinách případů (65,7%),

průměrná doba od propuknutí PN do manifestace činila  $7,6 \pm 5,9$  let. Více než polovina pacientů (55,7%) rozvinula příznaky dystonie, a to průměrně do  $5,2 \pm 4,5$  let. Nejčastěji byla dystonie lokalizována v oblasti dolních končetin (38,6%).

### **6.1.3. Non-motorické příznaky**

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

### **6.1.4. Komplikace, fluktuace hybnosti, polékové dyskineze a léčba**

Freezing a hesitace byly přítomny v polovině (52,9%) a posturální instabilita s pády ve čtvrtině (25,7%) případů. Průměrná doba od začátku PN do rozvoje freezingů a hesitací byla  $9,1 \pm 4,4$  let, respektive  $11,6 \pm 6,1$  let u pádů. Wearing-off (vyčerpání účinku dopaminergní medikace, zhoršení stavu na konci dávky) udávalo 70,0% pacientů s průměrným nástupem  $4,7 \pm 4,1$  roku od zahájení léčby. Dyskineze na vrcholu dávky (peak-of-dose) měla polovina nemocných (51,4%), průměrná doba od nasazení medikace do manifestace dyskinezi činila  $5,2 \pm 4,0$  let. Sleep benefit (zlepšení motorických příznaků po vyspání) popisovala rovněž polovina pacientů (50,0%). Výbornou odpovídavost na dopaminergní léčbu na začátku onemocnění udávaly více než dvě třetiny nemocných (68,6%). Prvním nasazeným lékem byla nejčastěji L-DOPA (35,7%), následovali dopaminergní agonisté (28,6%), inhibitory monoaminoxidázy B (11,4%) a anticholinergika (10,0%). U 14,3% případů byla použita jiná iniciální léčba (amantadin, clonazepam, trimepranol apod.). Doba od začátku nemoci do zahájení dopaminergní medikace činila  $3,5 \pm 2,5$  roku. L-DOPA užívalo 78,6% pacientů, průměrná denní dávka byla  $726,2 \pm 367,1$  mg. Přes dvě třetiny nemocných mělo nasazeno dopaminergní agonisty (68,6%), hluboká mozková stimulace byla implantována v necelé třetině případů (30,0%).

## **6.2. Rizikové faktory u pacientů a kontrol**

V době studie aktivně kouřilo 15,7% pacientů a 18,7% kontrol. Pět a více cigaret po dobu nejméně pěti let před začátkem PN kouřilo 34,3% nemocných, průměrná doba kouření před rozvojem PN byla  $12,8 \pm 5,0$ . Stejná kritéria, ovšem bez vztahu k onemocnění, splňovalo 25,3% kontrol. Průměrný počet cigaret vykouřených za den se mezi těmito skupinami nelišil (pacienti  $15,7 \pm 11,3$ ; kontroly  $15,6 \pm 10,1$ ;  $p = 0,98$ ) a nebylo prokázáno, že by kouření ovlivňovalo riziko rozvoje PN (OR = 1,54; 95% CI = 0,75 - 3,15;  $p = 0,24$ ). Pravidelné pití

kávy udávalo 47,1% pacientů a 77,3% zdravých dobrovolníků, bez signifikantního rozdílu v počtu vypitých šálků za den (pacienti  $1,7 \pm 1,1$ ; kontroly  $2,2 \pm 1,2$ ;  $p = 0,07$ ). Příjem kávy byl spojen se statisticky významným snížením rizika výskytu PN (OR = 0,26; 95% CI = 0,13 - 0,53;  $p = 0,0002$ ). Práci v zemědělství a expozici pesticidům či dalším chemikáliím po dobu více než jednoho roku referovalo 28,6% nemocných a 6,7% kontrol. Tento faktor představoval signifikantně vyšší riziko vzniku PN (OR = 5,6; 95% CI = 1,97 - 15,93;  $p = 0,0007$ ).

### 6.3. Alelické varianty *parkinu* u pacientů a kontrol

Polymorfismus p.S167N byl identifikován v podobném procentu u pacientů (7,1%) jako u kontrol (9,3%), stejně tomu bylo v případě polymorfismu p.D394N, který mělo 10,0% nemocných a 8,0% kontrol. Četnost polymorfismu p.V380L byla téměř dvakrát vyšší mezi kontrolami (25,3%) než mezi pacienty (14,3%). U jednoho pacienta (1,4%) a dvou kontrol (2,7%) byl zaznamenán výskyt dvou polymorfismů najednou (1x pacient a 1x kontrola: p.S167N + p.D394N; 1x kontrola: p.S167N + p.V380L). U jedné kontroly (1,3%) jsme našli novou alelickou variantu p.V380I (c.1138G>A) spolu s polymorfismem p.D394N. Varianta p.A82E (uvedená v HGMD jako mutace vyvolávající nemoc) byla přítomna u jednoho pacienta (1,4%), který měl rovněž polymorfismus p.D394N. Další alelická varianta p.R402C (v HGMD opět uvedená jako mutace vyvolávající nemoc) se vyskytovala mezi pacienty v jednom případě (1,4%) a byla také zaznamenána u jedné kontroly (1,3%), kde jsme zároveň identifikovali polymorfismus p.V380L.

Mutace *parkinu* jsme našli u pěti pacientů (7,1%), z nichž jeden (1,4%) měl bodovou mutaci p.R334C a zbylí čtyři (5,7%) exonové delece různého rozsahu. Všechny alelické varianty byly pozorovány v heterozygotní konstituci, kromě dvou homozygotních polymorfismů (1x pacient: p.V380L a 1x kontrola: p.S167N) a homozygotní delece exonu 4. Pacient s touto delecí měl pozitivní rodinnou anamnézu a byl též heterozygot pro delecí exonu 2-3 a polymorfismus p.V380L. Při porovnání souboru pacientů a kontrol nebyl v četnosti nalezených polymorfismů, alelických variant a mutací prokázán statisticky významný rozdíl (tabulka 1).

### 6.4. Testování hypotéz

Hypotéza  $H_{10}$  (fenotyp pacientů s mutacemi a bez mutací *parkinu* se neliší) byla zamítnuta, neboť byl prokázán signifikantní rozdíl ve věku při začátku EOPD u pacientů s mutacemi a bez mutací. Rovněž hypotéza  $H_{20}$  (mezi nemocnými a kontrolami není rozdíl v přítomnosti rizikových faktorů vnějšího prostředí) byla zamítnuta vzhledem k statisticky významným rozdílům v četnosti pití kávy a v prevalenci práce v zemědělství a s chemikáliemi. Hypotézu  $H_{30}$  (ve skupině pacientů a kontrol není rozdíl v prevalenci genetických změn *parkinu*) se zamítnout nepodařilo.

**Tabulka 1. Četnost genetických změn *parkinu* u pacientů (n=70) a kontrol (n=75)**

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

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

## **7. Diskuse**

### **7.1. Fenotyp**

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

#### **7.1.1. Začátek onemocnění, diagnóza**

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

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

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



úzkost, sebepoškozování) před samotným rozvojem hybných příznaků. V naší studii jsme však psychiatrické symptomy před začátkem hybných projevů nesledovali. Porucha chůze je u EOPD vzácným iniciačním příznakem (Wickremaratchi M.M. et al., 2009) a byla na začátku nemoci přítomna pouze u dvou (2,9%) pacientů.

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

Průměrnou dobu od začátku PN do určení diagnózy (3,4 roku) lze považovat za relativně uspokojivý výsledek, zejména v porovnání s diagnostickou prodlevou u jiných extrapyramidových onemocnění. Například Touretteův syndrom (tiková nemoc) je v ČR diagnostikován až s dvou a půl násobným zpožděním (8,5 let) (Fiala O. & Ruzicka E., 2003). Na druhou stranu recentní studie z Velké Británie uvádí průměrný interval do stanovení diagnózy 11 měsíců, což je téměř o 2,5 roku méně. Tato práce však hodnotila diagnostiku LOPD (věk při vzniku nemoci byl 66 - 73 let), je tedy možné, že na diagnostické prodlevě pacientů EOPD má podíl odlišný fenotyp onemocnění. Zejména časný začátek nemoci spojený s atypickými příznaky (bolest, dystonie, psychiatrické projevy) může činit diagnostické obtíže, což dosvědčují výsledky kanadských autorů, kteří u EOPD pozorovali 15 měsíční zpoždění ve stanovení diagnózy oproti LOPD (Rana A.Q. et al., 2012). V jejich skupině byli nemocní s EOPD diagnostikováni v průměru do 26 měsíců, tedy o 14 měsíců dříve, než tomu bylo v našem souboru.

### **7.1.2. Motorické příznaky**

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

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

Charakteristickým projevem EOPD je častý výskyt dystonie. V našem souboru ji měla více než polovina pacientů (55,7%), což odpovídá výsledkům většiny dalších studií (Grunewald A. et al., 2013; Kann M. et al., 2002; Lohmann E. et al., 2009; Lucking C.B. et al., 2000). Lokalizace dystonie vykazovala zjevný kraniokaudální gradient, nejvíce nemocných mělo dystonii dolních končetin, nejméně pak v oblasti hlavy a krku. V tomto ohledu je zajímavá podobnost fenotypu EOPD s fenotypem dopa-responzivní dystonie (DRD), u které se rovněž mohou manifestovat projevy parkinsonského syndromu (Lee W.W. & Jeon B.S., 2014). Obě nemoci spojuje řada klinických rysů: časný začátek, převaha výskytu dystonie na dolních končetinách či odpovídavost příznaků na L-DOPA. U DRD bývají přítomny diurnální fluktuační a zlepšení hybnosti po vyspání, které pozorují často i nemocní s EOPD (tzv. sleep benefit). Diferenciální diagnostika těchto dvou onemocnění může být proto v některých případech poměrně komplikovaná (Tassin J. et al., 2000).

### 7.1.3. Non-motorické příznaky

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

Ohledně hyposmie, jež má nejméně 75% pacientů s LOPD (Haehner A. et al., 2009) a která může o několik let předcházet rozvoji hybných projevů (Ross G.W. et al., 2008), panují u EOPD neshody. Původní studie z roku 2004 doložila zhoršení čichu pouze u nemocných bez přítomnosti mutace *parkinu*, na rozdíl od jedinců s mutací, kteří měli čich normální (Khan N.L. et al., 2004). Pozdější práce našla hyposmii mezi pacienty s heterozygotní mutací *parkinu*, zatímco přenašeči heterozygotní mutace bez projevů PN a složení heterozygoti se známkami PN, hyposmii neměli. Mechanismus, jakým mutace *parkinu* ovlivňují rozvoj hyposmie, však zůstává nejasný (Alcalay R.N. et al., 2011). Bez ohledu na přítomnost mutace, poruchu čichu udává 20 - 30% nemocných s EOPD (Kim H.J. et al., 2011; Spica V. et al., 2013). My jsme ji zaznamenali ve čtvrtině případů.

Ve vysokém procentu si pacienti stěžovali na poruchy spánku, zejména na nadměrnou denní spavost (48,6%), která může být potencována užíváním dopaminergní agonistů (Happe S. & Berger K., 2001). Častým symptomem byla také hypersalivace (43%), ostatní obtíže spojené gastrointestinálním traktem (obstipace, potíže při polykání) měla zhruba čtvrtina pacientů. V

podobném rozsahu trpěli nemocní i dalšími příznaky vegetativní dysfunkce, např. poruchami urogenitálního traktu (inkontinence, sexuální obtíže) a projevy ortostatické hypotenze. Bolest byla přítomna u 20% pacientů. Necelá pětina nemocných udávala vizuální halucinace, které bývají obvykle spojeny s dopaminergní medikací, zejména v pokročilejších stádiích PN (Zhou C.Q. et al., 2014).

#### **7.1.4. Komplikace, fluktuace hybnosti a polékové dyskineze**

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

#### **7.1.5. Léčba**

Výbornou odpovídavost na dopaminergní léčbu, zejména na začátku onemocnění, má většina nemocných s EOPD (Grunewald A. et al., 2013), což jsme pozorovali také u našich pacientů. Doba od prvních projevů PN do nasazení dopaminergní medikace (3,5 roku) byla téměř stejná jako prodleva od začátku nemoci do určení diagnózy (3,4 roku). To odráží rozhodující význam dopaminergní odpovídavosti mezi diagnostickými kritérii PN (Jankovic J., 2008). Dobrý kognitivní stav spolu s časným rozvojem dyskinezi a fluktuací, činí z pacientů s časným začátkem PN vhodné kandidáty pro léčbu hlubokou mozkovou stimulací (DBS - deep brain stimulation) (Bronstein J.M. et al., 2011). V našem souboru byla zavedena u 30% nemocných.

#### **7.2. Rizikové faktory**

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

V naší studii kouřilo aktivně 15,7% pacientů, což je v porovnání s prevalencí kouření v ČR (29,1%) (Gallus S. et al., 2014) poměrně malé číslo. Pro uplatnění rizikových faktorů je však zásadní míra expozice před rozvojem nemoci. Při detailnějším zkoumání výskytu kouření u nemocných bylo patrné, že řada z nich zanechala kouření cigaret krátce před či po začátku onemocnění, jiní naopak začali kouřit až v průběhu PN. Proto jsme pro analýzu rizika kouření vybrali pacienty, kteří kouřili před vznikem onemocnění. Za kritérium minimální expozice jsme považovali kouření pěti cigaret denně v intervalu alespoň pěti let (kumulativní dávka  $\geq$  9125 cigaret). Při stanovení této hranice jsme vycházeli z údajů týkajících se biologických účinků chronického stresu. Osoby vystavené chronickému stresu po dobu pěti let mají

významně vyšší riziko rozvoje kardiovaskulárních onemocnění (Rosengren A. et al., 1991). Recentní výzkum ukázal, že chronický stres má podobný klinický dopad jako kouření pěti cigaret denně (Richardson S. et al., 2012). Přepokládáme tedy, že námi zvolený práh kouření je dostatečnou kumulativní expozicí, která může ovlivnit rozvoj organického onemocnění (přínejmenším ischemické choroby srdeční). Takto definovaná kritéria splňovala třetina nemocných (34,3%) a čtvrtina kontrol. Průměrný počet vykouřených cigaret za den se u nemocných a kontrol signifikantně neodlišoval. V prevalenci kouření v obou skupinách nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl, protektivní vliv kouření na riziko rozvoje PN jsme tedy neprokázali.

V případě pití kávy jsme měli k dispozici méně anamnestických dat, než tomu bylo u kouření cigaret. Především chyběl údaj o celkové době příjmu kávy. Předpokládáme ale, že pití kávy je obvykle dlouhodobý zvyk. Počet vypitých šálků za den se mezi skupinou pacientů a kontrol významně nelišil. V našem souboru představovala káva faktor spojený se signifikantně nižším rizikem vzniku PN. Naopak práce v zemědělství a expozice pesticidům či jiným chemikáliím byla asociována s vyšším rizikem rozvoje PN. Výše uvedené výsledky bude třeba ověřit na větším souboru populačních kontrol, neboť u zdravých dobrovolníků (dárců krve), zejména s ohledem na prevalenci rizikových faktorů, hrozí výběrové zkresení (bias).

### **7.3. Genotyp**

#### **7.3.1. Polymorfismy**

Polymorfismy p.S167N a p.D394N byly přítomny téměř ve stejném měřítku mezi pacienty i kontrolami. Přestože jsou tyto genetické změny v HGMD klasifikovány jako polymorfismy asociované s nemocí (disease-associated polymorphism), meta-analytické studie neprokázaly asociaci těchto polymorfismů s rizikem vzniku PN (Zhang Y. et al., 2012a; Zhang Y. et al., 2012b). Polymorfismus p.V380L se vyskytoval bez mála dvakrát častěji u kontrol než u pacientů. Toto pozorování odpovídá výsledkům recentní meta-analýzy, která prokázala asociaci polymorfismu p.V380L s nižším rizikem rozvoje PN (Zhang Y. et al., 2013), navzdory tomu, že tento polymorfismus je v HGMD stále uveden mezi polymorfismy asociovanými s nemocí.

#### **7.3.2. Vzácné alelické varianty**

U jedné kontroly jsme našli novou alelickou variantu p.V380I (c.1138G>A). Analýza pomocí nástrojů MutPred s SIFT predikovala nízké riziko patogenního chování (tabulka 1). Varianta p.A82E (označená v HGMD jako mutace způsobující nemoc, disease causing mutation) byla identifikována u jednoho pacienta. Tato genetická změna s velkou pravděpodobností není patogenní. Byla pozorována u zdravých kontrol (Kay D.M. et al., 2007), má benigní predikční analýzu (tabulka 1) a nemá efekt na subcelulární distribuci parkinu in vitro (Cookson M.R. et al., 2003). Dle predikční analýzy působí alelická varianta

p.R402C poškození proteinu (tabulka 1) a rovněž v HGMD je řazena mezi mutace. Její patogenní vliv je však sporný, neboť byla popsána také u zdravých jedinců (Schlitter A.M. et al., 2006). V našem souboru jsme heterozygotní alelickou variantu p.R402C našli u jednoho pacienta a jedné kontroly. Frekvence recesivní alely (minor allele frequency) je podle údajů EVS 0,26%. Proto předpokládáme, že genetická změna p.R402C představuje nepatogenní tichou (silent) substituci.

### 7.3.3. Mutace

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

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

Ačkoli některé práce uvádějí vysokou frekvenci mutací *parkinu* u pacientů s EOPD (až 50% familiární a 18% sporadické formy) (Lucking C.B. et al., 2000; Monroy-Jaramillo N. et al., 2014), prevalence mutací v našem souboru, podobně jako v celé řadě dalších studií (Brooks J. et al., 2009; Choi J.M. et al., 2008; Kilarski L.L. et al., 2012; Mellick G.D. et al., 2009), byla relativně nízká (7,1%). Tyto rozdíly mezi studiemi mohou být vysvětleny více faktory, zejména populačně specifickou variabilitou četnosti alelických variant, různým poměrem nemocných s familiární a sporadickou formou EOPD ve studii, rozdílnými kritérii pro

maximální věk při vzniku EOPD či odlišnými pravidly, podle kterých byly alelické varianty klasifikovány jako mutace. Vzhledem k tomu, že jsme v naší práci neanalyzovali introny a oblast promotoru, je možné, že některé patogenní změny *parkinu* nebyly identifikovány. Na druhou stranu, mutace v oblasti intronů představují pouhých 8,2% ze všech známých mutací (Grunewald A. et al., 2013), takže pravděpodobnost jejich záchytu není příliš vysoká. U genetických změn promotoru navíc nebyla jednoznačně prokázána asociace s EOPD (Chang X.L. et al., 2011).

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

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

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

#### **7.4. Soubor pacientů a statistická analýza**

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

pacientů (n=70) spolu s nízkým výskytem mutací (n=5; 7,1%) představovaly hlavní limitaci statistické analýzy našich výsledků.

## **8. Závěr**

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

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

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

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

## 9. Literatura

- [1] Ahlskog JE. Parkin and PINK1 parkinsonism may represent nigral mitochondrial cytopathies distinct from Lewy body Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15 (10): 721-727.
- [2] Alcalay RN, Siderowf A, Ottman R, Caccappolo E, Mejia-Santana H, Tang MX et al. Olfaction in Parkin heterozygotes and compound heterozygotes: the CORE-PD study. *Neurology* 2011; 76 (4): 319-326.
- [3] Bonifati V. Genetics of Parkinson's disease--state of the art, 2013. *Parkinsonism Relat Disord* 2014; 20 Suppl 1 S23-28.
- [4] Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. Incidence and distribution of parkinsonism in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990. *Neurology* 1999; 52 (6): 1214-1220.
- [5] Bozi M, Papadimitriou D, Antonellou R, Moraitou M, Maniati M, Vassiliadis DK et al. Genetic assessment of familial and early-onset Parkinson's disease in a Greek population. *Eur J Neurol* 2013;
- [6] Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003; 24 (2): 197-211.
- [7] Bronstein JM, Tagliati M, Alterman RL, Lozano AM, Volkmann J, Stefani A et al. Deep brain stimulation for Parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. *Arch Neurol* 2011; 68 (2): 165.
- [8] Brooks J, Ding J, Simon-Sanchez J, Paisan-Ruiz C, Singleton AB, Scholz SW. Parkin and PINK1 mutations in early-onset Parkinson's disease: comprehensive screening in publicly available cases and control. *J Med Genet* 2009; 46 (6): 375-381.
- [9] Bruggemann N, Klein C. Parkin Type of Early-Onset Parkinson Disease. 1993;
- [10] Buhmann C, Binkofski F, Klein C, Buchel C, van Eimeren T, Erdmann C et al. Motor reorganization in asymptomatic carriers of a single mutant Parkin allele: a human model for presymptomatic parkinsonism. *Brain* 2005; 128 (10): 2281-2290.
- [11] Cookson MR, Lockhart PJ, McLendon C, O'Farrell C, Schlossmacher M, Farrer MJ. RING finger 1 mutations in Parkin produce altered localization of the protein. *Hum Mol Genet* 2003; 12 (22): 2957-2965.
- [12] Corti O, Lesage S, Brice A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiol Rev* 2011; 91 (4): 1161-1218.
- [13] de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006; 5 (6): 525-535.
- [14] de Mena L, Samaranch LL, Coto E, Cardo LF, Ribacoba R, Lorenzo-Betancor O et al. Mutational screening of PARKIN identified a 3' UTR variant (rs62637702) associated with Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 2013; 50 (2): 264-269.
- [15] Doherty KM, Silveira-Moriyama L, Parkkinen L, Healy DG, Farrell M, Mencacci NE et al. Parkin disease: a clinicopathologic entity? *JAMA Neurol* 2013; 70 (5): 571-579.
- [16] Douglas PM, Dillin A. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J Cell Biol* 2010; 190 (5): 719-729.
- [17] Fiala O, Ruzicka E. Mezinárodní databáze Touretteova syndromu: zapojení do projektu v České republice. *Cesk Slov Neurol N* 2003; 33/99 (3): 197-202.
- [18] Foltynie T, Kahan J. Parkinson's disease: an update on pathogenesis and treatment. *J Neurol* 2013; 260 (5): 1433-1440.
- [19] Gallus S, Lugo A, La Vecchia C, Boffetta P, Chaloupka FJ, Colombo P et al. Pricing Policies And Control of Tobacco in Europe (PPACTE) project: cross-national comparison of smoking prevalence in 18 European countries. *Eur J Cancer Prev* 2014; 23 (3): 177-185.
- [20] Gaweda-Walerych K, Safranow K, Jasinska-Myga B, Bialecka M, Klodowska-Duda G, Rudzinska M et al. PARK2 variability in Polish Parkinson's disease patients--interaction with mitochondrial haplogroups. *Parkinsonism Relat Disord* 2012; 18 (5): 520-524.
- [21] Gaweda-Walerych K, Zekanowski C. Integrated pathways of parkin control over mitochondrial maintenance - relevance to Parkinson's disease pathogenesis. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2013; 73 (2): 199-224.
- [22] Giovannini P, Piccolo I, Genitrini S, Soliveri P, Girotti F, Geminiani G et al. Early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 1991; 6 (1): 36-42.
- [23] Gowers W (1900) *A Manual of Diseases of the Nervous System*, Vol. 1, Philadelphia: Blakiston's Son.
- [24] Grunewald A, Kasten M, Ziegler A, Klein C. Next-generation phenotyping using the parkin example: time to catch up with genetics. *JAMA Neurol* 2013; 70 (9): 1186-1191.
- [25] Guerrero Camacho JL, Monroy Jaramillo N, Yescas Gomez P, Rodriguez Violante M, Boll Woehrlin C, Alonso Vilatela ME et al. High frequency of Parkin exon rearrangements in Mexican-mestizo patients with early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27 (8): 1047-1051.



- [26] Haehner A, Boesveldt S, Berendse HW, Mackay-Sim A, Fleischmann J, Silburn PA et al. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease--a multicenter study. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15 (7): 490-494.
- [27] Hagenah JM, Konig IR, Becker B, Hilker R, Kasten M, Hedrich K et al. Substantia nigra hyperechogenicity correlates with clinical status and number of Parkin mutated alleles. *J Neurol* 2007; 254 (10): 1407-1413.
- [28] Happe S, Berger K. The association of dopamine agonists with daytime sleepiness, sleep problems and quality of life in patients with Parkinson's disease--a prospective study. *J Neurol* 2001; 248 (12): 1062-1067.
- [29] Henn IH, Bouman L, Schlehe JS, Schlierf A, Schramm JE, Wegener E et al. Parkin Mediates Neuroprotection through Activation of I{kappa}B Kinase/Nuclear Factor-{kappa}B Signaling. *J Neurosci* 2007; 27 (8): 1868-1878.
- [30] Hilker R, Klein C, Ghaemi M, Kis B, Strotmann T, Ozelius LJ et al. Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial parkinsonism associated with mutations in the parkin gene. *Ann Neurol* 2001; 49 (3): 367-376.
- [31] Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55 (3): 181-184.
- [32] Cha G-H, Kim S, Park J, Lee E, Kim M, Lee SB et al. Parkin negatively regulates JNK pathway in the dopaminergic neurons of Drosophila. *PNAS* 2005; 102 (29): 10345-10350.
- [33] Chang XL, Mao XY, Li HH, Zhang JH, Li NN, Burgunder JM et al. Functional parkin promoter polymorphism in Parkinson's disease: new data and meta-analysis. *J Neurol Sci* 2011; 302 (1-2): 68-71.
- [34] Chaugule VK, Burchell L, Barber KR, Sidhu A, Leslie SJ, Shaw GS et al. Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO J* 2011; 30 (14): 2853-2867.
- [35] Choi JM, Woo MS, Ma HI, Kang SY, Sung YH, Yong SW et al. Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease. *Neurogenetics* 2008; 9 (4): 263-269.
- [36] Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 2001; 105 (7): 891-902.
- [37] Jankovic J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79 (4): 368-376.
- [38] Kann M, Jacobs H, Mohrmann K, Schumacher K, Hedrich K, Garrels J et al. Role of parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2002; 51 (5): 621-625.
- [39] Kay DM, Moran D, Moses L, Poorkaj P, Zabetian CP, Nutt J et al. Heterozygous parkin point mutations are as common in control subjects as in Parkinson's patients. *Ann Neurol* 2007; 61 (1): 47-54.
- [40] Keller MF, Saad M, Bras J, Bettella F, Nicolaou N, Simon-Sanchez J et al. Using genome-wide complex trait analysis to quantify 'missing heritability' in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2012; 21 (22): 4996-5009.
- [41] Khan NL, Brooks DJ, Pavese N, Sweeney MG, Wood NW, Lees AJ et al. Progression of nigrostriatal dysfunction in a parkin kindred: an [18F]dopa PET and clinical study. *Brain* 2002; 125 (10): 2248-2256.
- [42] Khan NL, Graham E, Critchley P, Schrag AE, Wood NW, Lees AJ et al. Parkin disease: a phenotypic study of a large case series. *Brain* 2003; 126 (Pt 6): 1279-1292.
- [43] Khan NL, Katzenschlager R, Watt H, Bhatia KP, Wood NW, Quinn N et al. Olfaction differentiates parkin disease from early-onset parkinsonism and Parkinson disease. *Neurology* 2004; 62 (7): 1224-1226.
- [44] Kiebertz K, Wunderle KB. Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Mov Disord* 2013; 28 (1): 8-13.
- [45] Kilarski LL, Pearson JP, Newsway V, Majounie E, Njike MD, Misbahuddin A et al. Systematic review and UK-based study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2012; 27 (12): 1522-1529.
- [46] Kim HJ, Lee JY, Yun JY, Kim SY, Park SS, Jeon BS. Phenotype analysis in patients with early onset Parkinson's disease with and without parkin mutations. *J Neurol* 2011; 258 (12): 2260-2267.
- [47] Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392 (6676): 605-608.
- [48] Kitao Y, Imai Y, Ozawa K, Kataoka A, Ikeda T, Soda M et al. Pael receptor induces death of dopaminergic neurons in the substantia nigra via endoplasmic reticulum stress and dopamine toxicity, which is enhanced under condition of parkin inactivation. *Hum Mol Genet* 2007; 16 (1): 50-60.
- [49] Klein C. Implications of genetics on the diagnosis and care of patients with Parkinson disease. *Arch Neurol* 2006; 63 (3): 328-334.

- [50] Klein C, Lohmann-Hedrich K, Rogaeva E, Schlossmacher MG, Lang AE. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurol* 2007; 6 (7): 652-662.
- [51] Klein C, Westenberger A. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2 (1): a008888.
- [52] Kostic VS, Filipovic SR, Lecic D, Momcilovic D, Sokic D, Sternic N. Effect of age at onset on frequency of depression in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57 (10): 1265-1267.
- [53] Koziarowski D, Hoffman-Zacharska D, Slawek J, Szirkowicz W, Janik P, Bal J et al. Low frequency of the PARK2 gene mutations in Polish patients with the early-onset form of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2010; 16 (2): 136-138.
- [54] Laitinen J, Samarut J, Holtta E. A nontoxic and versatile protein salting-out method for isolation of DNA. *Biotechniques* 1994; 17 (2): 316, 318, 320-312.
- [55] Lee WW, Jeon BS. Clinical spectrum of dopa-responsive dystonia and related disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2014; 14 (7): 461.
- [56] Leroux P (1890) Contribution à l'étude des causes de la paralysie agitante. in Thesis, Paris.
- [57] Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 2009; 18 (R1): R48-59.
- [58] Lohmann E, Periquet M, Bonifati V, Wood NW, De Michele G, Bonnet AM et al. How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol* 2003; 54 (2): 176-185.
- [59] Lohmann E, Thobois S, Lesage S, Broussolle E, du Montcel ST, Ribeiro MJ et al. A multidisciplinary study of patients with early-onset PD with and without parkin mutations. *Neurology* 2009; 72 (2): 110-116.
- [60] Lubbe S, Morris HR. Recent advances in Parkinson's disease genetics. *J Neurol* 2014; 261 (2): 259-266.
- [61] Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T et al. Association between Early-Onset Parkinson's Disease and Mutations in the Parkin Gene. *N Engl J Med* 2000; 342 (21): 1560-1567.
- [62] MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 2014; 508 (7497): 469-476.
- [63] Machida Y, Chiba T, Takayanagi A, Tanaka Y, Asanuma M, Ogawa N et al. Common anti-apoptotic roles of parkin and alpha-synuclein in human dopaminergic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 332 (1): 233-240.
- [64] Marder KS, Tang MX, Mejia-Santana H, Rosado L, Louis ED, Comella CL et al. Predictors of parkin mutations in early-onset Parkinson disease: the consortium on risk for early-onset Parkinson disease study. *Arch Neurol* 2010; 67 (6): 731-738.
- [65] Mellick GD, Siebert GA, Funayama M, Buchanan DD, Li Y, Imamichi Y et al. Screening PARK genes for mutations in early-onset Parkinson's disease patients from Queensland, Australia. *Parkinsonism Relat Disord* 2009; 15 (2): 105-109.
- [66] Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 2010; 11 (1): 31-46.
- [67] Monroy-Jaramillo N, Guerrero-Camacho JL, Rodriguez-Violante M, Boll-Woehrlen MC, Yescas-Gomez P, Alonso-Vilatela ME et al. Genetic mutations in early-onset Parkinson's disease Mexican patients: molecular testing implications. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2014; 165B (3): 235-244.
- [68] Moura KC, Campos Junior M, de Rosso AL, Nicaretta DH, Pereira JS, Silva DJ et al. Genetic analysis of PARK2 and PINK1 genes in Brazilian patients with early-onset Parkinson's disease. *Dis Markers* 2013; 35 (3): 181-185.
- [69] Padmaja MV, Jayaraman M, Srinivasan AV, Srisailapathy CR, Ramesh A. PARK2 gene mutations in early onset Parkinson's disease patients of South India. *Neurosci Lett* 2012; 523 (2): 145-147.
- [70] Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, Ricard S et al. Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 2003; 126 (Pt 6): 1271-1278.
- [71] Pilsl A, Winklhofer KF. Parkin, PINK1 and mitochondrial integrity: emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 2012; 123 (2): 173-188.
- [72] Rana AQ, Siddiqui I, Yousuf MS. Challenges in diagnosis of young onset Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2012; 323 (1-2): 113-116.
- [73] Richardson S, Shaffer JA, Falzon L, Krupka D, Davidson KW, Edmondson D. Meta-analysis of perceived stress and its association with incident coronary heart disease. *Am J Cardiol* 2012; 110 (12): 1711-1716.
- [74] Rosengren A, Tibblin G, Wilhelmsen L. Self-perceived psychological stress and incidence of coronary artery disease in middle-aged men. *Am J Cardiol* 1991; 68 (11): 1171-1175.
- [75] Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K et al. Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2008; 63 (2): 167-173.

- [76] Sekeff-Sallem FA, Barbosa ER. Diagnostic pitfalls in Parkinson's disease: case report. *Arq Neuropsiquiatr* 2007; 65 (2A): 348-351.
- [77] Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minooshima S et al. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; 25 (3): 302-305.
- [78] Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R et al. Ubiquitination of a New Form of alpha -Synuclein by Parkin from Human Brain: Implications for Parkinson's Disease. *Science* 2001; 293 (5528): 263-269.
- [79] Schlitter AM, Kurz M, Larsen JP, Woitalla D, Muller T, Epplen JT et al. Parkin gene variations in late-onset Parkinson's disease: comparison between Norwegian and German cohorts. *Acta Neurol Scand* 2006; 113 (1): 9-13.
- [80] Schrag A, Ben-Shlomo Y, Brown R, Marsden CD, Quinn N. Young-onset Parkinson's disease revisited- clinical features, natural history, and mortality. *Mov Disord* 1998; 13 (6): 885-894.
- [81] Schrag A, Schott JM. Epidemiological, clinical, and genetic characteristics of early-onset parkinsonism. *Lancet Neurol* 2006; 5 (4): 355-363.
- [82] Schulz JB, Falkenburger BH. Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res* 2004; 318 (1): 135-147.
- [83] Singleton AB, Farrer MJ, Bonifati V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord* 2013; 28 (1): 14-23.
- [84] Spica V, Pekmezovic T, Svetel M, Kostic VS. Prevalence of non-motor symptoms in young-onset versus late-onset Parkinson's disease. *J Neurol* 2013; 260 (1): 131-137.
- [85] Srivastava A, Tang MX, Mejia-Santana H, Rosado L, Louis ED, Caccappolo E et al. The relation between depression and parkin genotype: the CORE-PD study. *Parkinsonism Relat Disord* 2011; 17 (10): 740-744.
- [86] Stochl J, Hagtvet KA, Brozova H, Klempir J, Roth J, Ruzicka E. Handedness does not predict side of onset of motor symptoms in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009; 24 (12): 1836-1839.
- [87] Sun M, Latourelle JC, Wooten GF, Lew MF, Klein C, Shill HA et al. Influence of Heterozygosity for Parkin Mutation on Onset Age in Familial Parkinson Disease: The GenePD Study. *Arch Neurol* 2006; 63 (6): 826-832.
- [88] Swinn L, Schrag A, Viswanathan R, Bloem BR, Lees A, Quinn N. Sweating dysfunction in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; 18 (12): 1459-1463.
- [89] Tassin J, Durr A, Bonnet AM, Gil R, Vidailhet M, Lucking CB et al. Levodopa-responsive dystonia. GTP cyclohydrolase I or parkin mutations? *Brain* 2000; 123 ( Pt 6) 1112-1121.
- [90] Twelves D, Perkins KS, Counsell C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; 18 (1): 19-31.
- [91] Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA et al. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol* 2003; 157 (11): 1015-1022.
- [92] Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H. The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology* 2007; 27 (5): 494-506.
- [93] Walter U, Klein C, Hilker R, Benecke R, Pramstaller PP, Dressler D. Brain parenchyma sonography detects preclinical parkinsonism. *Mov Disord* 2004; 19 (12): 1445-1449.
- [94] Weiner WJ. There is no Parkinson disease. *Arch Neurol* 2008; 65 (6): 705-708.
- [95] Wickremaratchi MM, Ben-Shlomo Y, Morris HR. The effect of onset age on the clinical features of Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 2009; 16 (4): 450-456.
- [96] Zhang Y, Wang ZZ, Sun HM. Lack of association between p.Ser167Asn variant of Parkin and Parkinson's disease: a meta-analysis of 15 studies involving 2,280 cases and 2,459 controls. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012a; 159B (1): 38-47.
- [97] Zhang Y, Wang ZZ, Sun HM. Meta-analysis of the influence of Parkin p.Asp394Asn variant on the susceptibility of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2012b; 524 (1): 60-64.
- [98] Zhang Y, Wang ZZ, Sun HM. A meta-analysis of the relationship of the Parkin p.Val380Leu polymorphism to Parkinson's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2013; 162B (3): 235-244.
- [99] Zhou CQ, Zhang JW, Wang M, Peng GG. Meta-analysis of the efficacy and safety of long-acting non-ergot dopamine agonists in Parkinson's disease. *J Clin Neurosci* 2014; 21 (7): 1094-1101.

## **10. Seznam publikací doktoranda:**

### **Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace**

a) s IF (celkem 5,38)

1. **Fiala O**, Zahorakova D, Pospisilova L, Kucerova J, Matejkova M, Martasek P, Roth J, Ruzicka E. Parkin (PARK 2) mutations are rare in Czech patients with early-onset Parkinson's disease. Plos One (**IF = 3,730**) (*v recenzním řízení*)
2. **Fiala O**, Pospisilova L, Prochazkova J, Matejkova M, Martasek P, Novakova L, Roth J, Ruzicka E. Parkin mutations and phenotypic features in Czech patients with early-onset Parkinson's disease. Neuro Endocrinol Lett. 2010;31(2):187-92. (**IF = 1,404**)
3. **Fiala O**, Růžička E. Genetika Parkinsonovy nemoci. Ces Slov Neurol Neurochir 2009;72:419-428. (**IF = 0,246**)

b) bez IF

-

### **Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace**

a) s IF (celkem 12,24)

4. Xu H, Rösler TW, Carlsson T, de Andrade A, **Fiala O**, Höllerhage M, Oerteld WH, Goedert M, Aigner A, Höglinger GU. Therapeutic Tau Silencing by siRNA in P301S Tauopathy Mouse Model. Curr Gene Ther (**IF = 5,318**) (*v tisku*)
5. Bonnet C, Rusz J, Megrelshvili M, Matoušková O, Okujava O, Brožová H, Sieger T, Nikolai T, Hanuška J, Kapianidze M, Mikeladze N, Botchorishvili N, Janelidze M, Serranová T, **Fiala O**, Roth J, Bergquist J, Rivaud-Péchoix S, Bertrand G, Růžička E. Eye Movements in Ephedrone-induced Parkinsonism and Parkinson's Disease. Plos One. (**IF = 3,730**) (*v recenzním řízení*)
6. Garakh Z, Zaytseva Y, Kapranova A, **Fiala O**, Horacek J, Shmukler A, Gurovich I, Strelets V. EEG correlates of mental arithmetic task in first episode of schizophrenia and schizoaffective disorder. Clin Neuropsych. (**IF = 3,144**) (*v recenzním řízení*)
7. **Fiala O**, Růžička E. Mezinárodní databáze Touretteova syndromu - zapojení do projektu v České republice. Čes a Slov Neurol Neurochir 2003; 197-202. (**IF = 0,047**)

b) bez IF

8. **Fiala O**. Tiky a Touretteův syndrom - současné možnosti léčby. Remedia 2013; 176-179.
9. **Fiala O**. Tiky a Touretteův syndrom. Neurologie pro praxi 2011; 382-385.
10. **Fiala O**, Růžička E. Dyskinetické syndromy dětského věku. Posgrad med 2006; 925-930.
11. **Fiala O**, Růžička E. Touretteův syndrom. Sanquis 2005; 24-26.
12. Růžička E, Malá E, **Fiala O**. Touretteův syndrom - klinická diagnóza a léčba. Postgraduální medicína 2003; 436-443.
13. **Fiala O**. Očkovací adjuvancia. Remedia 2002; 205-207.
14. **Fiala O**, Růžička E. International database of Tourette syndrome: pilot study of the project in Czech Republic. Homeostasis 2001; 146-151.