



ROZPRAWA DOKTORSKA

*mgr anal. med. Anna Elżbieta Oczkowska*

**Analiza mutacji genów  
*SNCA, PARK2, LRRK2, HTRA2* i *SPR*  
u chorych z chorobą Parkinsona**

Praca wykonana w Pracowni Neurobiologii, Katedry Neurologii  
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
pod kierunkiem: **dr hab. Jolanty Dorszewskiej**

Praca dofinansowana z grantu uczelnianego nr  
oraz z projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych  
za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”,  
Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego  
przez Unię Europejską w Ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Poznań 2013

## Spis treści

1.	Wstęp .....	1
1.1.	Choroba Parkinsona rys historyczny.....	2
1.2.	Definicja choroby Parkinsona .....	4
1.3.	Epidemiologia choroby Parkinsona .....	5
1.4.	Objawy kliniczne choroby Parkinsona.....	7
1.5.	Diagnostyka choroby Parkinsona.....	9
1.6.	Farmakoterapia w chorobie Parkinsona .....	11
1.7.	Zmiany neuropatologiczne w chorobie Parkinsona .....	12
1.8.	Podłoże molekularne choroby Parkinsona .....	14
1.9.	Rola Alfa-synukleiny w patogenezie choroby Parkinsona.....	16
1.9.1.	Budowa i funkcje Alfa-synukleiny .....	16
1.9.2.	Czynniki wpływające na agregację alfa-synukleiny w chorobie Parkinsona.....	18
1.9.3.	Mutacje w genie kodującym alfa-synukleinę, a proces agregacji ASN .....	19
1.9.4.	Znaczenie stabilności struktury tetramerów alfa-synukleiny w procesie jej agregacji .....	22
1.9.5.	Patologiczne białka neuronalne, a agregacja alfa-synukleiny .....	22
1.9.6.	Oddziaływanie dopaminy i alfa-synukleiny .....	23
1.9.7.	Wpływ kinazy LRRK2 na proces agregacji ASN .....	27
1.9.8.	Białko HTRA2 – budowa i funkcje.....	29
1.9.9.	Udział parkiny w agregacji alfa-synukleiny.....	32
1.10.	Inne schorzenia układu pozapiramidowego .....	36
1.11.	Badania genetyczne a diagnostyka i terapia choroby Parkinsona .....	37
2.	Cel pracy .....	39
3.	Materiały i metody .....	40
3.1.	Materiały .....	40
3.1.1.	Grupa badana .....	40
3.1.2.	Grupy chorych z innymi zaburzeniami układu pozapiramidowego.....	42
3.1.3.	Grupa kontrolnych ochotników.....	42
3.1.4.	Materiał do badań genetycznych.....	42
3.1.5.	Aparatura.....	43
3.1.6.	Odczynniki chemiczne .....	43
3.1.7.	Oprogramowanie i bazy danych używane do projektowania analiz oraz obróbki uzyskanych danych .....	44
3.2.	Metody .....	45
3.2.1.	Izolacja DNA genomowego z komórek krwi obwodowej .....	45

3.2.2. Kryteria wyboru genów PARK (uznanych i kandydackich) do badań genetycznych .....	46
3.2.3. Wyznaczanie starterów do analizy genów PARK.....	47
3.2.4. Badanie występowania delekcji eksonów 2 i 4 genu PRKN metodą PCR .....	48
3.2.5. Badanie Mutacji Punktowych w eksonach 4, 7, 11 genu PRKN oraz eksonu 41 genu LRRK2 z zastosowaniem metod HRM, PCR i sekwencjonowania .....	50
3.2.6 Analiza mutacji punktowych genów SNCA, PRKN, HTRA2 i SPR metodą PCR i analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych RFLP .....	52
3.2.7 Analiza polimorfizmu regionu NACP-Rep1 metodą PCR i elektroforezy kapilarnej	54
3.2.8 Kontrola jakości przeprowadzonych badań .....	54
3.2.9 Analiza statystyczna.....	55
4. Wyniki.....	56
4.1. Analiza mutacji w regionie kodującym oraz odcinku paromotorowym genu SNCA.....	56
4.1.1. Analiza występowania mutacji c.88 G>C genu SNCA.....	56
4.1.2. Analiza polimorfizmu ilości powtórzeń dwunukleotydowych w obrębie regionu NACP-Rep1 promotora genu SNCA .....	57
4.2. Analiza delekcji i mutacji punktowych genu PRKN .....	60
4.2.1. Analiza częstości występowania delekcji eksonów 2 i 4 genu PRKN.....	60
4.2.2. Analiza częstości występowania mutacji punktowych w exonach 2, 4, 7, 8, 11 genu PRKN .....	61
4.3. Analiza mutacji punktowych w obrębie eksonu 41 genu LRRK2 .....	67
4.4. Analiza występowania mutacji punktowych genu HTRA2 .....	67
4.5. Analiza występowania mutacji w obrębie kodonu SPR.....	69
4.6. Współwystępowanie mutacji punktowych w analizowanych genach PARK .....	71
4.6.1. Występowanie więcej niż jednej mutacji punktowej w genie PRKN .....	71
4.6.2. Współwystępowanie mutacji punktowych genu PRKN i polimorfizmu regionu NACP-Rep1 promotora genu SNCA .....	72
4.6.3. Współwystępowanie Polimorfizmu regionu NACP-Rep1 genu SNCA z mutacjami w genie HTRA2 lub SPR.....	75
4.7. Ocena wpływu mutacji w analizowanych genach park na ryzyko ujawnienia się choroby Parkinsona .....	75
4.7.1. mutacje w analizowanych genach park a rozwój choroby Parkinsona .....	76
5. Dyskusja.....	79
6. Wnioski .....	89
7. Streszczenie.....	90
8. Abstract .....	92
9. Piśmiennictwo .....	94

10.	Spis rycin.....	106
11.	Spis tabel.....	109

## Wykaz stosowanych skrótów:

**5-HT** - serotonina, 5-hydroksytryptamina

**A** - alanina

**AADC** - dekarboksylaza aminokwasów aromatycznych (ang. *amino acid decarboxylase*)

**ASN** - alfa-synukleina (ang. *alpha-synuclein*)

**ATP** - adenozyotrójfosforan (ang. *adenosine triphosphate*)

**A $\beta$**  -  $\beta$ -amyloid (ang. *amyloid beta*)

**BH4** - tetrahydrobiopteryna (ang. *tetrahydrobiopterin*)

**BLAST** (ang. *basic local alignment search tool*)

**BSN** - beta-synukleina (ang. *beta-synuclein*)

**chA** - choroba Alzheimera

**chP** - choroba Parkinsona

**COMT** - katecholo-O-metyltransferaza (ang. *catechol-O-methyltransferase*)

**DA** - dopamina

**DAT** – transporter dopaminy (ang. *dopamine transporter*, DAT)

**E** - kwas glutaminowy

**HTRA2** (ang. *high temperature requirement protein*)

**ICD-10** (ang. *International Classification of Diseases*)

**K** - lizyna

**KT** - tomografia komputerowa

**LB** - ciała Lewy'ego (ang. *Lewy body*)

**LRRK2** (ang. *leucine-rich repeat kinase-2*)

**M** - metiona

**MAO-B** - monoaminotransferaza B (ang. *monoamine oxidase B*)

**MchP** - młodzieńczej choroba Parkinsona

**MCI** - łagodne zaburzenia funkcji poznawczych (ang. *mild cognitive impairment*)

**MMSE** - Krótka Skala Oceny Stanu Umysłowego (ang. *Mini Mental State Examination*)

**MPTP** - 1-metylo-4fenylo-1,2,3,6-tetrahydro-pirydyna (ang. *1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine*)

**MRI** - rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging*,)

- MSA** - zanik wieloukładowy (ang. *multiple system atrophy*)
- MSA-C** - MSA z dominującymi objawami mózdkowymi
- MSA-P** - MSA z dominującymi objawami parkinsonowskimi
- mtDNA** - mitochondrialne DNA
- NAC** (ang. *non amyloid- $\beta$  component*)
- OR** - iloraz szans (ang. *Ods Ratio*)
- OUN** - ośrodkowy układ nerwowy
- P** - prolina
- PchP** - choroba Parkinsona o późnym początku
- PCR** – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
- PET** - pozytonowa tomografia emisyjna (ang. *positron emission tomography*)
- PINK1** (ang. *PTEN induced putative kinase 1*)
- PLD2** - fosfolipaza D2 (ang. *phospholipase D2*)
- PRKN** - gen parkiny (ang. *parkin*)
- PS1**- presenilina-1 (ang. *preseniline-1*)
- PSP** - postępujące porażenie nadjądrowe (ang. *progressive supranuclear palsy*)
- RchP** - rodzinna choroba Parkinsona
- RFLP** – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*)
- RT-PCR/HRM** - (ang. *real time-PCR/high resolution melting*)
- SchP** – sporadyczna choroba Parkinsona
- SNCA** - gen kodujący alfa- synukleinę (ang. *synuclein alpha*)
- SPECT** - tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (ang. *single photon emission computed tomography*)
- SPR** - gen reduktazy sepiapteryny (ang. *sepiapterin reductase*)
- SR** - reduktaza sepiapteryny (ang. *sepiapterin reductase*)
- T** - treonina
- TFAM** - mitochondrialny czynnik transkrypcyjny A (ang. *Mitochondrial transcription factor A*)

## Wykaz stosowanych skrótów

---

**HT** - hydroksylaza tyrozyny (ang. *tyrosine hydroxylase*)

**TPH** - hydroksylaza tryptofanu (ang. *tryptophane hydroxylase*)

**UBL** - domena homologiczna z ubikwityną (ang. *N-terminal ubiquitin-like domain*)

**UKPDSBB** (ang. *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank*)

**UPD** (ang. *unique parkin domain*)

**WchP** - choroba Parkinsona o wczesnym początku

**WHO** - Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

# 1. Wstęp

Rozwój nauki i techniki w drugiej połowie XX wieku doprowadził do wydłużenia średniej długości życia, które przyczyniło się do zwiększonej liczby zachorowań na schorzenia typowe dla wieku starczego, w tym także na chorobę Parkinsona (chP). Obecnie chP jest jedną z najczęściej występujących chorób zwyrodnieniowych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) i dotyczy niemal 2% populacji w wieku powyżej 65 r.ż. oraz 5% w wieku powyżej 85 r.ż.. Co więcej, z danych szacunkowych wynika, że w obliczu starzenia się społeczeństw, liczba chorych na tę chorobę neurozwyrodnieniową będzie utrzymywała tendencję wzrostową.

Chociaż chP została opisana po raz pierwszy blisko 200 lat temu, nadal pozostaje chorobą nieuleczalną, a jej przyczyna nie jest w pełni poznana. Obecnie wiadomo, że w przebiegu chP dochodzi do zaniku neuronów dopaminergicznych w obrębie istoty czarnej śród mózgowia na skutek toczącego się procesu zwyrodnieniowego, a przyczyną tego zaniku komórek nerwowych jest odkładanie się patologicznych form białek, takich jak:  $\alpha$ -synukleina, parkina czy białko tau. Wykazano, że białka te tworzą złogi zaburzające metabolizm komórkowy i neuroprzeżywalność w obrębie struktur objętych chorobą. Wiadomo również, że zaburzenia w strukturze patologicznych białek mogą być wynikiem oddziaływania zarówno czynników środowiskowych, jak i genetycznych. Mimo licznych doniesień w piśmiennictwie z zakresu molekularnego podłoża tej choroby, wciąż niewiele wiadomo o zachodzących interakcjach między poszczególnymi genami odpowiedzialnymi za kodowanie patologicznych białek i ujawnienie się chP.

Skutkiem braku znajomości mechanizmów patogenezy chP jest również niemożność wczesnego, pewnego przyżyciowego rozpoznania tej choroby. Obecnie diagnostyką chP opiera się na kryteriach klinicznych, poszerzonych o badania neuroobrazowe i stanowi jedynie prawdopodobne rozpoznanie tej choroby. Pewne rozpoznanie chP jest możliwe dopiero po badaniu neuropatologicznym na obecność w mózgu chorych zmian typowych dla tej choroby, wykonywanym post mortem.

Jak wiadomo, brak wczesnego, pewnego rozpoznania chP może utrudnić podjęcie skutecznej terapii przyczyniając się do postępu choroby oraz do obniżenia komfortu życia chorych. Obecnie uważa się, że badania genetyczne mogą stanowić istotny element diagnostyki przyżyciowej chorych z chP, a wyjaśnienie mechanizmu wzajemnego oddziaływania pomiędzy genami związanymi z patogenezą choroby prawdopodobnie może pomóc w wyjaśnieniu nieznanych dróg selektywnego uszkodzenia neuronów dopaminergicznych w przebiegu chP.

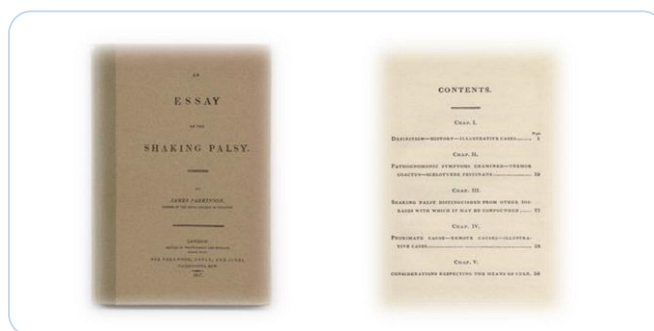


## 1.1. CHOROBA PARKINSONA RYS HISTORYCZNY

„...a kiedy Bóg Ra postarzał się, jego sylwetką pochyliła się,  
zaczął chodzić drobnymi krokami, a z ust wypływała mu ślina...”  
papirus Sterna

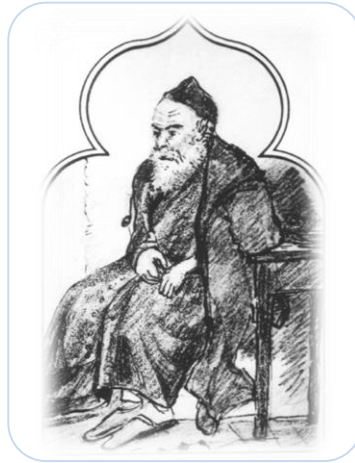
Pierwsze opisy chP pojawiły się już w czasach starożytnych. Za najstarszy z opisów uważany jest egipski papirus Sterna pochodzący z XIII wieku p.n.e.. Kolejne opisy choroby przynosi biblijna Księga Koheleta czy księgi Ayurvedy [1]. W czasach nowożytnych opisy chP pojawiają się na początku XIX wieku.

Za odkrywcę chP uważa się londyńskiego lekarza Jamesa Parkinsona, który w 1817 roku po raz pierwszy opisał podstawowe objawy tej choroby w pracy: *An Essay on the Shaking Palsy* (Ryc. 1) [2].



Ryc. 1. Pierwszy opis choroby Parkinsona autorstwa Jamesa Parkinsona z 1817 roku [3].

Autor nazwał tę chorobę „*drżączką porażną*” i nazwa ta była używana aż do czasu, kiedy to francuski neurolog Jean-Martin Charcot zwrócił uwagę na fakt, że w przebiegu tego schorzenia nie zawsze występuje drżenie, a ponadto u chorych z chP nie obserwuje się porażenia. Jednocześnie Charcot nazwał chorobę od nazwiska odkrywcy, chP (Ryc. 2). Ponadto, Charcot i Armand Trousseau uzupełnili pierwotny opis kliniczny choroby o nowe objawy, takie jak: sztywność mięśni, bradykinezja, propulsja, retropulsja i mikrografia, rozróżniając jednocześnie drżenie zamiarowe od drżenia spoczynkowego [4]. Natomiast w latach 80-tych XIX wieku ukazała się praca *Manual of Diseases of the Nervous System* (1886-1888), w której angielski neurolog Ser William Gowers przedstawił niemal pełny obraz kliniczny i przebieg chP.



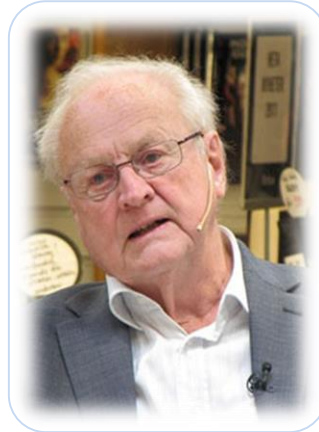
Ryc. 2. Chory z chorobą Parkinsona. Rysunek Charcota z Maroco z 1889 roku [5].

Pół wieku po odkryciu chP, w 1867 roku, uczeń Charcota, Leopold Ordenstein, zauważył zblednięcie istoty czarnej podczas badania autopsyjnego mózgu chorego z chP. Cztery lata później, wiedeński psychiatra Meynert wysunął hipotezę, o istotnej roli jąder podstawy mózgu w powstawaniu ruchów mimowolnych. Jednak dopiero wiek XX przyniósł kluczowe dla poznania chP odkrycia neuropatologiczne. W 1914 roku, Frederic Lewy opisał występowanie w jądrach niektórych neuronów dopaminergicznych charakterystycznych wtrętów określanых dziś mianem ciał Lewy'ego (ang. *Lewy body*, LB), a w 1919 roku Konstantin Trietiakoff w badaniach będących podstawą jego rozprawy doktorskiej potwierdził kluczową rolę uszkodzeń istoty czarnej w patofizjologii parkinsonizmu [6]. Kilkanaście lat później, prace Hasslera i Greenberga przyniosły opis zmian zwyrodnieniowych również w innych jądrach pnia mózgu [4].

Za odkrywcę zmian biochemicznych leżących u podstaw chP, uważany jest szwedzki biochemik Arvida Carlsson (Ryc. 3), który w 1957 roku wykazał znaczące obniżenie się poziomu dopaminy (DA) w komórkach układu dopaminergicznego, zaburzające funkcjonowanie jąder podstawy mózgu, stanowiące jednocześnie przyczynę objawów klinicznych w chP. Za to odkrycie Carlsson otrzymał w 2000 roku *Nagrodę Nobla* w dziedzinie medycyny.

Natomiast rolę DA w patogenezie chP opisali Herbert Ehringer i Leopold Hornykiewicz dopiero w 1960 roku [8]. Następstwem tego przełomowego odkrycia było wprowadzenie w 1968 roku L-dopy do terapii chP. Mimo, że sześć lat wcześniej Watson i Crick odbierali *Nagrodę Nobla* za odkrycie struktury DNA (w 1962 roku), era odkryć w dziedzinie genetyki chP miała dopiero nastąpić. Kluczowe białko chP – alfa-synukleina (ang. *alpha-synuclein*, ASN) zostało odkryte w pęcherzykach synaptycznych Torpedo Californica dopiero w 1988 roku [10]. Pierwszą znaną

we włoskiej rodzinie Contrusi mutację w genie *SNCA* (ang. *synuclein alpha*) kodującym białko ASN, będącą jednocześnie pierwszą mutacją zidentyfikowaną w chP, opisano w 1990 roku [9]. Natomiast w 1998 roku po raz pierwszy opisano mutacje w genie dla białka parkiny (ang. *parkin, PRKN*) [11]. W rzeczywistości przełom wieku XX i XXI stał się też przełomem w badaniach nad genetycznym uwarunkowaniem chP.



Ryc. 3. Arvid Carlsson [7].

## 1.2. DEFINICJA CHOROBY PARKINSONA

Choroba Parkinsona to samoistna, powoli postępująca, zwyrodnieniowa choroba OUN, charakteryzująca się klinicznie: spowolnieniem ruchowym, sztywnością mięśni i drżeniem spoczynkowym, będąca następstwem zaniku komórek istoty czarnej śródmózgowia oraz dramatycznego zmniejszenia ilości dopaminy w prążkowie [1].

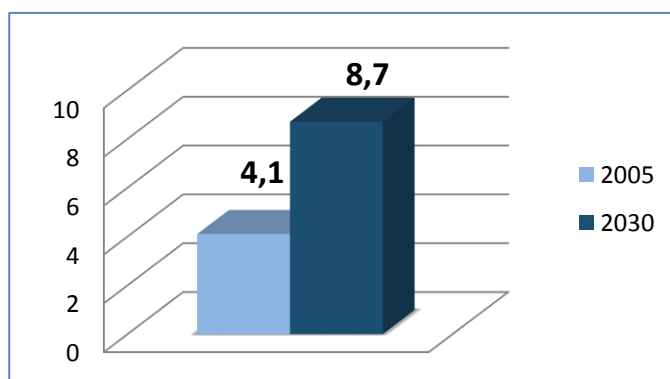
### 1.3. EPIDEMIOLOGIA CHOROBY PARKINSONA

*„Ludzie zawsze pytają mnie czy zadaję sobie pytanie: dlaczego ja?  
Odpowiadam im: Dlaczego nie ja?”  
Michael J. Fox*

Choroba Parkinsona jest jedną z najczęstszych chorób zwyrodnieniowych OUN. Według danych szacunkowych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *World Health Organization*, WHO) na świecie cierpi na nią ok. 5 mln osób. W samej Europie problem tej choroby zwyrodnieniowej dotyka ok. 1,2 mln osób. Cierpi na nią ok. 1 mln Amerykanów i ok. 100 000 Brytyjczyków [11,12]. Jak wynika z badań epidemiologicznych w Stanach Zjednoczonych średnio, co 9 minut diagnozuje się nowy przypadek chP, co daje ok. 60 000 zachorowań rocznie. W Polsce liczba chorych na chP wynosi ok. 70 000, a rocznie odnotowuje się ok. 8 000 nowych zachorowań [1]. Mężczyźni chorują na chP nieco częściej niż kobiety.

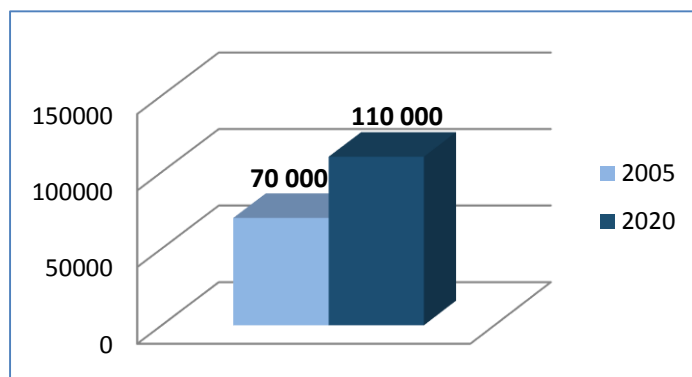
Choroba Parkinsona jest zasadniczo chorobą wieku starszego. Przyjmuje się, że średni wiek zachorowania na chP wynosi 58 lat. Przypadki chP o wczesnym początku (WchP), tzn. ujawniającej się przed 40 r.ż. występują stosunkowo rzadko. Jeszcze rzadziej opisywane są przypadki tzw. młodzieńczej chP (MchP), z początkiem objawów klinicznych przed 30 r.ż. [13,14]. Uważa się, że o ile częstość występowania chP w populacji generalnej wynosi ok. 0,15%, to w populacji starszej niż 70 lat, wzrasta dziesięciokrotnie osiągając 1,5%, a w grupie osób powyżej 85 r.ż. nawet 2,6% [15,16].

Biorąc pod uwagę zjawisko starzenia się społeczeństw sugeruje się, że liczba chorych na chP będzie wzrastać na całym świecie i do 2030 roku może ulec podwojeniu w stosunku do danych z 2005 (Ryc. 4) [17,18].



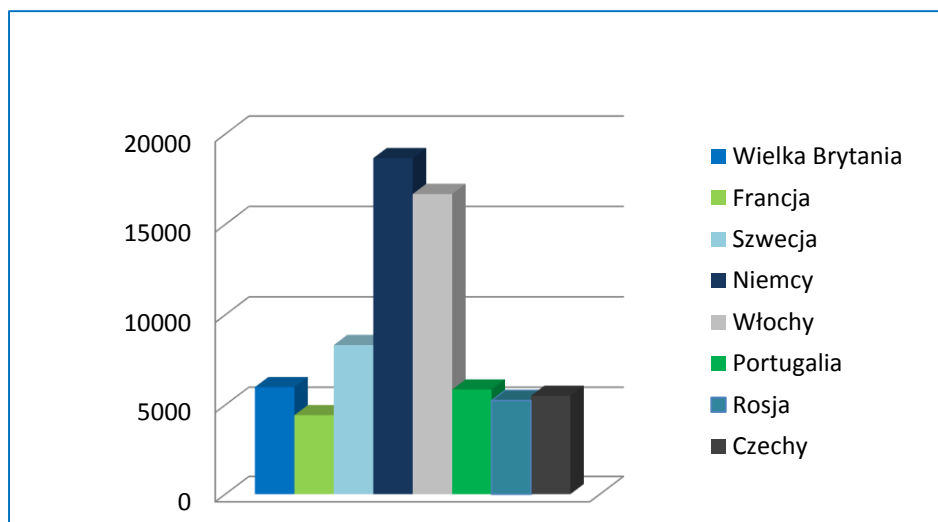
Ryc. 4. Liczba chorych na chorobę Parkinsona na świecie w 2005 roku i szacunkowa liczba chorych na chorobę Parkinsona w 2030 roku (w mln) [17,18].

Szacuje się, że w Polsce w 2020 roku liczba osób po 65 r.ż. może wynieść 7,9 mln, co jednocześnie oznacza, że ok. 110 000 z nich najprawdopodobniej będzie chorować na chP. Choroba ta staje się, więc coraz większym problemem nie tylko medycznym, ale również społecznym i ekonomicznym (Ryc. 5).



Ryc. 5. Liczba chorych na chorobę Parkinsona w Polsce w 2005 roku i szacunkowa liczba chorych w 2030 roku [1,17].

Problem ekonomiczny dla gospodarki wielu krajów wynika z faktu, że koszt opieki zdrowotnej nad chorym z chP obecnie wynosi od 5 000 do 10 000 Euro rocznie. Zatem chP kosztuje społeczeństwo Europy blisko 11 bilionów Euro rocznie, a niektóre dane wskazują, że nawet blisko 14 bilionów Euro (Ryc. 6) [19,20]. W Stanach Zjednoczonych chP pochłania według danych szacunkowych od 6 do 25 miliardów USD rocznie.



Ryc. 6. Koszty rocznej opieki nad chorym na chorobę Parkinsona w wybranych państwach Europy (dane w Euro) [20].

## 1.4. OBJAWY KLINICZNE CHOROBY PARKINSONA

Jako cztery główne objawy chP wymienia się:

- ✓ drżenie spoczynkowe,
- ✓ spowolnienie ruchowe,
- ✓ sztywność mięśni,
- ✓ zaburzenia stabilności postawy.

Najczęściej pierwszym objawem klinicznym chP jest drżenie spoczynkowe jednej ręki. U chorych mogą pojawić się również zaburzenia równowagi, stabilności postawy lub ograniczenie w wykonywaniu prostych czynności, takich jak: wstawanie z krzesła lub łóżka. Oprócz drżenia może wystąpić niesprawność jednej kończyny górnej lub jej dystoniczne ustawienie przy chodzeniu [1]. Charakterystyczna dla chP jest również pochylona sylwetka ciała spowodowana wzmożonym napięciem mięśni przykręgosłupowych, a także chód drobnymi krokami (Ryc. 7).



Ryc. 7. Ilustracja przedstawiająca charakterystyczne cechy postawy ciała u osoby chorej na chorobę Parkinsona (autor: Sir William Richard Gowers) [21].

Jednocześnie wzmożone napięcie mięśni karku powoduje unoszenie głowy podczas leżenia na plecach (tzw. objaw „poduszki powietrznej”). Obserwuje się także ograniczenie amplitudy ruchów, objawiające się mikrografią i hipomimią. Charakterystyczna jest też monotonna mowa chorego pozbawiona intonacji, co jest związane z ograniczeniem ruchu strun głosowych. Z czasem pojawiają się zaburzenia równowagi mogące prowadzić do częstych upadków [1,15].

Jak wiadomo w chP poza zaburzeniami ruchowymi, występują również zaburzenia neuropsychiatryczne, obejmujące m.in. otępienie, stany depresyjne i ujawnienie się charakterystycznych cech osobowości oraz dysfunkcje układu autonomicznego.

Otępienie w przebiegu chP występuje u 20-40% chorych. Podstawową skalą służącą do oceny funkcji poznawczych jest Krótka Skala Oceny Stanu Umysłowego (ang. *Mini Mental State Examination*, MMSE) obejmująca ocenę m.in. zapamiętywania, orientacji w czasie i miejscu, uwagi i iczenia, funkcji językowych, przypomnienia oraz powtarzania [22].

W chP uszkodzenie układu autonomicznego obejmuje zmiany o charakterze neurodegeneracyjnym oraz występowanie LB w obrębie neuronów ośrodkowych (pień mózgu, podwzgórze) i obwodowych (sploty sercowe, sploty śródścienne jelita oraz zwoje współczulne) [23]. Wykazano, że u ponad 80% chorych z chP obserwuje się występowanie objawów ze strony układu autonomicznego, chociaż u części chorych zaburzenia w tym układzie pozostają bezobjawowe. Obecnie, wśród zaburzeń układu autonomicznego w przebiegu chP najczęściej wymienia się: zaparcia, zaburzenia węchu, ślinotok i łojotok, hipotonię ortostatyczną, arytmie serca czy dysfagię. Co ciekawe, według niektórych autorów, część z tych zaburzeń, szczególnie zaparcia i zaburzenia węchu oraz smaku, mogą nawet o kilka lat wyprzedzać objawy ruchowe w chP [1,24,25].

Postęp chP najczęściej oceniany jest w pięciostopniowej skali zaproponowanej przez amerykańskich neurologów, Hoehn i Yahra (Tab. 1) [26].

Tab. 1. Skala zaawansowania choroby Parkinsona według Hoehn i Yahra (H-Y) [26]

Stopień zaawansowania choroby w skali H-Y	Objawy kliniczne
1	Objawy jednostronne, bez wyraźnego wpływu na codzienne funkcjonowanie chorego i upośledzenia czynnościowego.
2	Objawy obustronne lub osiowe, wciąż z przewagą objawów po jednej stronie ciała. Brak zaburzeń równowagi. Obserwuje się prawie wszystkie typowe objawy choroby: hipomimię, hipotonię, wolniejszy chód, przodopochylenie, upośledzenie sprawności ruchowej.
3	Wyraźne objawy obustronne. Pierwsze objawy upośledzenia odruchów postawy. Chory zachowuje niezależność w życiu codziennym, choć wiele czynności wykonuje z trudem i znacznie wolniej. Przyjmuje również sylwetkę i chód parkinsonowski.
4	Występuje znaczne upośledzenie sprawności ruchowej. Chory wymaga pomocy przy czynnościach dnia codziennego. Funkcja samodzielnego stania i chodzenia jest nadal zachowana, pomimo licznych upadków.
5	Przy braku pomocy przywiązanie do łóżka lub wózka inwalidzkiego. Chory jest całkowicie zależny od otoczenia (głównie siedzi lub leży). Chód jest możliwy jedynie przy pomocy opiekunów.

## 1.5. DIAGNOSTYKA CHOROBY PARKINSONA

Za względu na brak przeżyciowych testów diagnostycznych w chP, rozpoznanie tej choroby neurologicznej opiera się o kliniczne kryteria rozpoznania prawdopodobnej chP, według UKPDSBB (ang. *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank*) [178] i przebiega w kilku etapach.

W pierwszym etapie rozpoznania chP diagnozuje się zespół parkinsonowski jeśli u chorych występuje spowolnienie ruchowe oraz przynajmniej jeden z wymienionych objawów:

- ✓ sztywność mięśniowa,
- ✓ drżenie spoczynkowe o częstości 4-6 Hz,
- ✓ zaburzenia stabilności postawy niespowodowane zaburzeniami wzrokowymi, uszkodzeniem błędniaka lub mózdzku, czy też zaburzeniami czucia głębokiego [27,28].

W kolejnym etapie rozpoznania chP przeprowadza się analizę kryteriów wykluczających rozpoznanie chP, obejmujących:

- ✓ udar mózgu w wywiadzie ze skokową progresją objawów parkinsonowskich,
- ✓ kilkakrotne urazy głowy w wywiadzie,
- ✓ przebyte zapalenie mózgu,
- ✓ napady „wejrzeniowe”,
- ✓ stosowanie neuroleptyków w momencie pojawienia się objawów parkinsonizmu,
- ✓ występowanie podobnych objawów u więcej niż jednego członka rodziny,
- ✓ długo utrzymującą się remisję,
- ✓ wyłączenie jednostronności objawów przy dłuższym niż 3 lata trwaniu choroby,
- ✓ porażenie skojarzonego ruchu gałek ocznych,
- ✓ objawy mózdkowe,
- ✓ wczesne pojawienie się poważnych zaburzeń autonomicznych,
- ✓ wczesne pojawienie się znacznego stopnia otępienia z zaburzeniami pamięci, mowy i praktyki,
- ✓ obecność objawu Babińskiego,
- ✓ obecność guza mózgu lub wodogłowia normotensyjnego w neuroobrazowaniu,
- ✓ brak reakcji na duże dawki L-dopy po wykluczeniu zaburzeń wchłaniania,
- ✓ kontakt z 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine (MPTP) w wywiadzie [1].



Podczas diagnostyki różnicowej chP analizie podlegają również kryteria dodatkowo potwierdzające rozpoznanie tej choroby, do których należą:

- ✓ jednostronny początek,
- ✓ obecność drżenia spoczynkowego,
- ✓ postęp choroby,
- ✓ utrzymywanie się asymetrii objawów przy postępie choroby,
- ✓ bardzo dobra reakcja na L-dopę (poprawa rzędu 70-100%)
- ✓ pojawienie się nasilonych dyskinez płasawicznych w przebiegu leczenia L-dopą,
- ✓ utrzymywanie się dobrej reakcji na L-dopę przez co najmniej 5 lat,
- ✓ długotrwała, powyżej 10 lat, obserwacja kliniczna.

Rozpoznanie klinicznie pewnej chP odbywa się w oparciu o stwierdzenie obecności u chorych, co najmniej 3 spośród dodatkowych kryteriów rozpoznania tej choroby. Ponadto, opracowano tzw. uproszczone kryteria diagnostyczne w chP i przyjęto następującą terminologię:

**możliwa choroba Parkinsona:** charakter postępujący, obecność przynajmniej 2 z 3 następujących cech: akinezja, sztywność, drżenie spoczynkowe oraz brak cech nietypowych,

**prawdopodobna choroba Parkinsona:** kryteria, jak powyżej i 2 cechy z poniższych: wyrażona odpowiedź na L-dopę, występowanie fluktuacji i dyskinez związanych z leczeniem L-dopą, asymetria objawów,

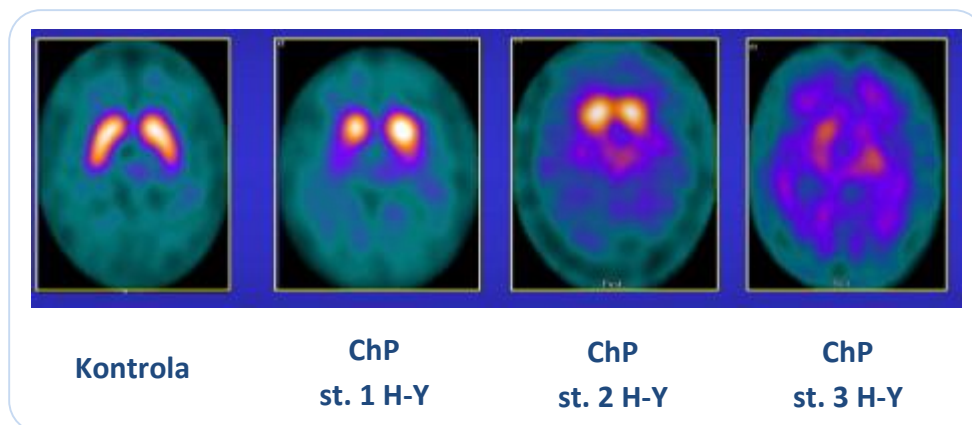
**potwierdzona choroba Parkinsona:** spełnione kryteria kliniczne i potwierdzenie w badaniu neuropatologicznym zwyrodnienia istoty czarnej, obecność LB w istocie czarnej oraz brak wtrętów w oligodendrogleju [29].

Rozpoznanie chP często jest problematyczne, zwłaszcza na początku choroby, a kryteria kliniczne nie zawsze rozwiązują wątpliwości diagnostyczne [30]. Szczególnie trudne jest różnicowanie chP oraz zaniku wieloukładowego (ang. *multiple system atrophy*, MSA) i postępującego porażenia nadjądrowego (ang. *progressive supranuclear palsy*, PSP).

Pomocniczo w chP wykonuje się badania neuroobrazowe: tomografię komputerową (KT), rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI), tomografię emisyjną pojedynczych fotonów (ang. *single photon emission computed tomography*, SPECT) oraz pozytonową tomografię emisyjną (ang. *positron emission tomography*, PET).

Tomografia komputerowa i MRI znajdują zastosowanie przede wszystkim w diagnostyce wtórnych zespołów parkinsonowskich. U chorych wykonuje się również badanie PET z zastosowaniem 17-fluorodopy, które pozwala na wykazanie obniżenia metabolizmu DA w strukturach dotkniętych procesem chorobowym (Ryc. 8). Jednakże,

ze względu na ograniczoną dostępność i bardzo wysoki koszt, badanie wykonywane jest głównie w celach naukowych, a jego znaczenie dla celów klinicznych jest obecnie ograniczone [1]. Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem metody SPECT do rutynowej diagnostyki chP. Metoda ta wykorzystuje znaczniki izotopowe w celu wykazania deficytu DA w obrębie prążkowiec. Jest tańsza i bardziej dostępna niż PET. Jej wadą jest jednak brak możliwości rozróżnienia chP od atypowych zespołów parkinsonowskich [31].



Ryc. 8. Przykładowy obraz badania pozytonowej tomografii emisyjnej u chorych z chorobą Parkinsona w różnym stadium zaawansowania choroby (od 1 do 3 stopnia) i osoby kontrolnej [32].

Pomimo postępów w diagnostyce i leczeniu chP, nadal jedynym badaniem potwierdzającym pewne rozpoznanie chP pozostaje ocena neuropatologiczna na obecność patologicznych zmian w OUN, wykonywana *post mortem* [33].

## 1.6. FARMAKOTERAPIA W CHOROBY PARKINSONA

Od lat 60-tych XX wieku podstawowym lekiem stosowanym w leczeniu chP jest L-dopa. Niestety skuteczność terapii L-dopą u chorych z chP często maleje wraz z postępem choroby oraz wiąże się z występowaniem licznych skutków ubocznych, głównie zaburzeń ruchowych. Zarówno doniesienia literaturowe z 1969 roku, Yahra i wsp., jak i wyniki badania ELLDOPA [34,35] wykazały, że u chorych z chP leczonych L-dopą pojawiają się fluktuacje i dyskinezy zależne nie tylko od czasu podawania leku, ale także od jego dawki. Obecnie zalecane jest

stosowanie L-dopy od wczesnych etapów choroby ze zwróceniem szczególnej uwagi na stosowanie najniższych skutecznych dawek [36].

Terapią alternatywną do terapii L-dopą w chP jest podawanie chorym agonistów receptorów dopaminowych, które w bezpośredni sposób pobudzają receptory dopaminowe, wykazując jednocześnie dłuższy biologiczny okres półtrwania leku. Badania ostatnich lat wykazały, że agoniści receptorów dopaminowych poza działaniem pobudzającym na receptory dopaminergiczne komórek nerwowych prądkowia mogą wykazywać również działanie neuroprotektyjne [37] oraz hamować proces agregacji ASN [38]. Jednakże często skuteczność działania agonistów receptorów dopaminowych jest mniejsza od L-dopy oraz może powodować więcej skutków ubocznych.

U chorych z chP kwestia wyboru farmakoterapii, L-dopą czy agonistami dopaminy, wymaga oceny ryzyka wystąpienia objawów niepożądanych oraz indywidualnego podejścia do chorego. Niemniej jednak, obecnie L-dopa pozostaje najskuteczniejszym i najlepiej tolerowanym lekiem stosowanym w objawowym leczeniu chP.

Międzynarodowe wytyczne dotyczące leczenia chP zalecają rozpoczęcie leczenia w początkowym okresie choroby jednym lekiem – L-dopą, agonistą receptorów dopaminergicznych lub inhibitorem monoaminotransferazy B (ang. *monoamine oxidase B*, MAO-B; selegilina, rasagalina), a w przypadku niewystarczającej odpowiedzi na leczenie dopaminergiczne włączenie L-dopy z inhibitorem katechoł-O-metyltransferazy (ang. *catechol-O-methyltransferase*, COMT), zwiększającym penetrację L-dopy do OUN, lub dołączenie do leczenia dopaminergicznego, selegiliny, rasagiliny, amantadyny, czy cholinolityków. Sugeruje się również rozważenie leczenia chirurgicznego [33,39-41].

Na całym świecie prowadzi się badania nad poszukiwaniem skutecznej terapii w chP, a zarazem leków o działaniu neuroprotektyjnym i hamującym proces zwyrodnieniowy w obrębie istoty czarnej w śródmózgowiu chorych z chP.

## 1.7. ZMIANY NEUROPATHOLOGICZNE

### W CHOROBIE PARKINSONA

W obrazie neuropatologicznym mózgu chorych z chP obserwuje się przede wszystkim zanik neuronów dopaminergicznych w obrębie istoty czarnej szczególnie w jej części zbitej, co jednocześnie prowadzi do zmniejszenia gęstości dopaminergicznych zakończeń nerwowych w prądkowiu. Zanik komórek nerwowych w chP dotyczy nie tylko neuronów

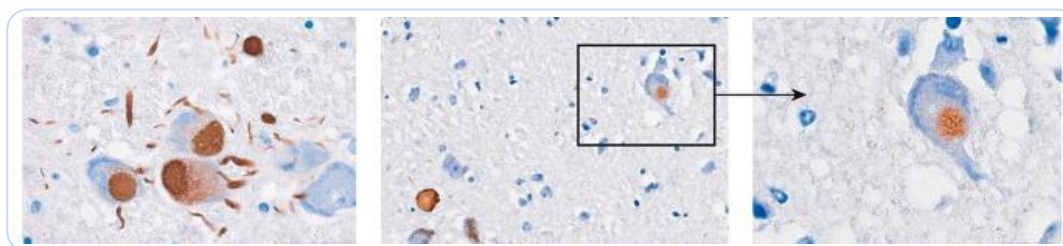
dopaminergicznych, ale także serotonergicznych czy cholinergicznych i jest obserwowany również w obrębie innych struktur OUN, takich jak: jądro sinawe, jądra szwu oraz jądra podstawne Meynerta. Zanik neuronów stwierdza się także w obrębie jądra grzbietowego nerwu błędnego, opuszki węchowej, jąder wzgórza, kory limbicznej oraz w obwodowych neuronach współczulnych układu sercowo-naczyniowego i pokarmowego [1,39].

W obszarach dotkniętych chP, obserwuje się również w cytoplazmie komórek nerwowych obecność patologicznych, okrągłych bądź wielopłatowych wtretów komórkowych, zwanych LB. Wykazano, że LB mogą odkładać się w pniu mózgu, korze mózgu i podkorowej istocie szarej, a ich lokalizacja zależy od stadium rozwoju choroby.

W okresie bezobjawowym ich obecność obserwowano w rdzeniu przedłużonym, moście oraz w miejscu sinawym, a także w obrębie struktur drogi węchowej. W stadium 3 i 4 rozwoju choroby, według Braaka pojawiały się w istocie czarnej oraz jądrach nerwów językowo-gardłowego i błędnego, a w ostatnich stadiach rozwoju choroby (5 i 6) także w obrębie kory mózgu [42].

Obecność LB wykazano u większości chorych z chP, ale nie obserwowano ich w niektórych postaciach rodzinnej chP (RchP). Jak wiadomo, obecność LB nie jest patognomiczna dla chP. Ciała Lewy'ego pojawiają się również w innych schorzeniach neurodegeneracyjnych zaliczanych do alfasynukleinopatii i w przebiegu fizjologicznego procesu starzenia [43].

U chorych z chP w badaniach immunohistochemicznych wykazano obecność dodatkowych patologicznych struktur, charakterystycznych włókienek będących degenerującymi wypustkami neuronów, tzw. neurytów Lewy'ego (Ryc. 9) [44].



Ryc. 9. Histopatologiczny obraz przedstawiający neuryty i ciała Lewy'ego [45].

Z badań struktury LB wynika, że w ich skład wchodzi liczne, ubikwitynowane i wolne białka, takie jak: elementy cytoszkieletu komórkowego, fragmenty kompleksu ubikwityna-proteasom, monomery ubikwityny, ASN, parkina oraz białko tau [1].

## 1.8. PODŁOŻE MOLEKULARNE CHOROBY PARKINSONA

Przyczyna zmian patologicznych w chP, podobnie jak w innych chorobach neurozwyrodnieniowych nie jest całkowicie poznana. Wiadomo, że proces zwyrodnieniowy w OUN chorych z chP na wiele lat wyprzedza pojawienie się objawów klinicznych. Obecnie, procesy patologiczne toczące się w tej chorobie zwyrodnieniowej wyjaśnia się w oparciu o kilka hipotez (Ryc. 10).

Jedną z hipotez zakłada, że przyczyną chP prawdopodobnie może być odkładanie się w określonych strukturach OUN patologicznych białek o nieprawidłowej konformacji przestrzennej, prowadzące do zaburzenia metabolizmu komórek nerwowych i rozwoju procesu zwyrodnieniowego. Uważa się, że w RchP patologiczne białka powstają w wyniku mutacji genu je kodującego, natomiast w postaciach sporadycznych chP (SchP) są wynikiem posttranslacyjnych modyfikacji [46].

Według innej hipotezy w chP dochodzi do uszkodzenia i śmierci neuronów na skutek dysfunkcji układu ubikwityna-proteasom. W warunkach fizjologicznych układ ten bierze udział w rozpoznaniu nieprawidłowych białek przez komórkowe mechanizmy kontrolne, ubikwitynowaniu i skierowaniu ich na drogę eliminacji w proteasomach. Jak wiadomo, do procesu usuwania białek, zarówno do ubikwitynizacji, jak i do degradacji w proteasomach, niezbędna jest energia. Sugeruje się, że niepełna wydajność układu ubikwityna-proteasom w chP, może być spowodowana spadkiem energii wywołanej defektem I kompleksu mitochondrialnego oraz zmniejszoną produkcją adenylotryfosforanu (ang. *adenosine triphosphate*, ATP) [1,47,48].

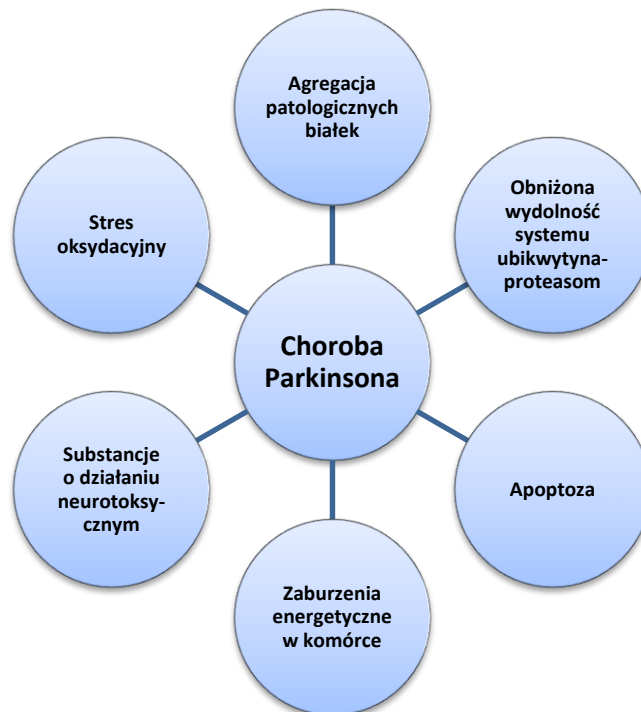
Z zaburzeniem energetycznym związana jest też kolejna teoria, wskazująca na udział stresu oksydacyjnego w uszkodzeniu komórek nerwowych [1]. Liczne doniesienia wskazują również na związek patogenezy chP z procesem apoptozy [49].

Przyczyny chP upatruje się także w czynnikach genetycznych. Jak do tej pory opisano wiele genów związanych z występowaniem RchP i/lub odpowiadających im miejsc genowych oznaczonych jako PARK. Geny PARK oraz ich loci zestawiono w tabeli 2 (PARK1–PARK16) [50]. Wykazano, że ich produkty białkowe m.in. ASN i parkina należą do istotnych czynników rozwoju zmian zwyrodnieniowych w chP.

Tab. 2. Opisanie miejsca genowe dla rodzinnej choroby Parkinsona i odpowiadające im geny [50]

Locus	Lokalizacja na chromosomie	Gen	Sposób dziedziczenia
<b>PARK1, PARK4</b>	4q21	<i>SNCA</i>	AD
<b>PARK2</b>	6q25.2-q27	<i>PRKN</i>	AR
<b>PARK3</b>	2p13	Nieznany	AD
<b>PARK5</b>	4p14	<i>UCHL1</i>	AD
<b>PARK6</b>	1p35-p36	<i>PINK1</i>	AR
<b>PARK7</b>	1p36	<i>DJ1</i>	AR
<b>PARK8</b>	12p12	<i>LRRK2</i>	AD
<b>PARK9</b>	1p36	<i>ATP13A2</i>	AR
<b>PARK10</b>	1p32	Nieznany	AD
<b>PARK11</b>	2q37.1	<i>GIGYF2</i>	AD
<b>PARK12</b>	Xq21-q25	Nieznany	?
<b>PARK13</b>	2p13	<i>HTRA2</i>	?
<b>PARK14</b>	22q13.1	<i>PLA2G6</i>	AR
<b>PARK15</b>	22q12-q13	<i>FBXO7</i>	AR
<b>PARK16</b>	1q32	<i>SLC41A1</i>	?

AR- autosomalnie recesywnie, AD- autosomalnie dominująco.



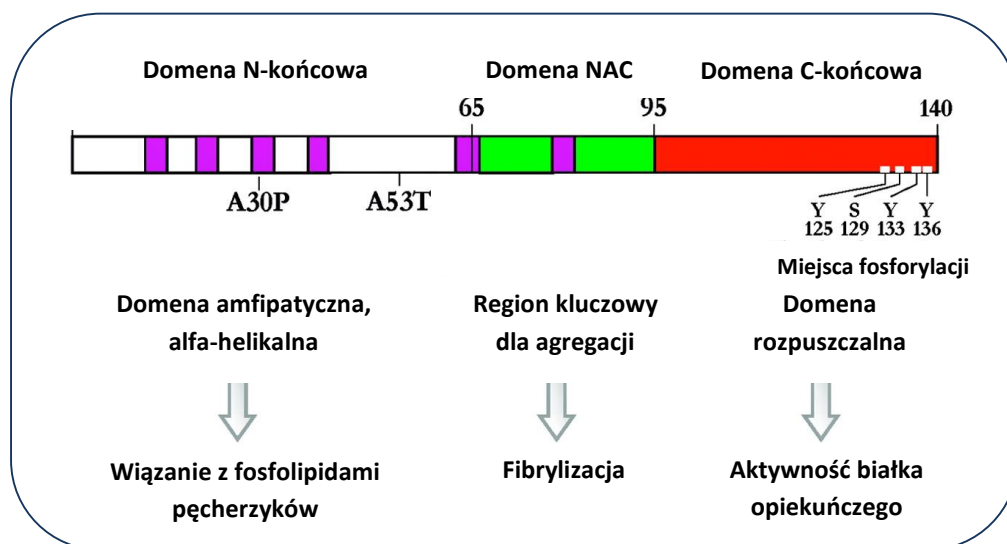
Ryc. 10. Schematyczne ujęcie mechanizmów potencjalnie włączonych w patomechanizm choroby Parkinsona.

## 1.9. ROLA ALFA-SYNUKLEINY W PATOGENEZIE

### CHOROBY PARKINSONA

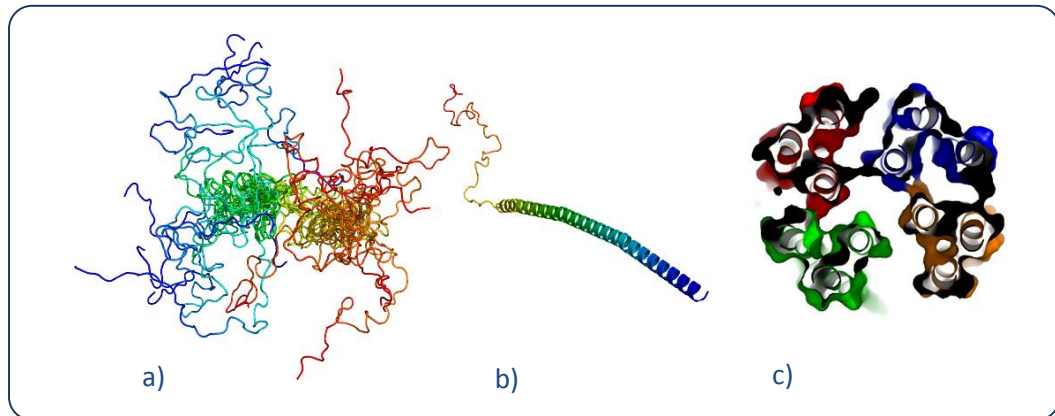
#### 1.9.1. BUDOWA I FUNKCJE ALFA-SYNUKLEINY

Alfa-synukleina jest białkiem zbudowanym ze 140 aminokwasów i należy do wspólnej rodziny białek wraz z  $\beta$ - i  $\gamma$ -synukleiną [51]. W budowie ASN wyróżnia się w obrębie N-końca region amfipatyczny zawierający sześć konserwowanych powtórzeń KTKEGV, centralny region hydrofobowy, w skład którego wchodzi domena NAC (ang. *non amyloid- $\beta$  component*), oraz C-końcowy region o charakterze kwasowym (Ryc. 11) [52].



Ryc. 11. Schemat budowy alfa-synukleiny [52].

Przez wiele lat struktura ASN określana była jako „niezwinęty” łańcuch aminokwasów, przyjmujący postać helikalną jedynie w połączeniu z lipidami błon komórkowych. Sądono, że ASN występuje pod postacią monomerów, jednak najnowsze badania wykazały, że ASN w warunkach fizjologicznych w znacznej mierze przyjmuje postać tetramerów i może występować pod postacią helikalną bez połączenia z lipidami błonowymi (Ryc. 12) [53].



Ryc. 12. Modele budowy alfa-synukleiny: a) w postaci rozpuszczalnej, b) w postaci heliakalnej, c) w postaci tetrameru [54,55].

W badaniach immunohistochemicznych wykazano, że ASN zasadniczo występuje w postaci związanej zarówno z błoną jądrową, jak i w obrębie pęcherzyków synaptycznych [56]. Natomiast w mniejszym stopniu występuje ona w postaci wolnej w obrębie cytoplazmy.

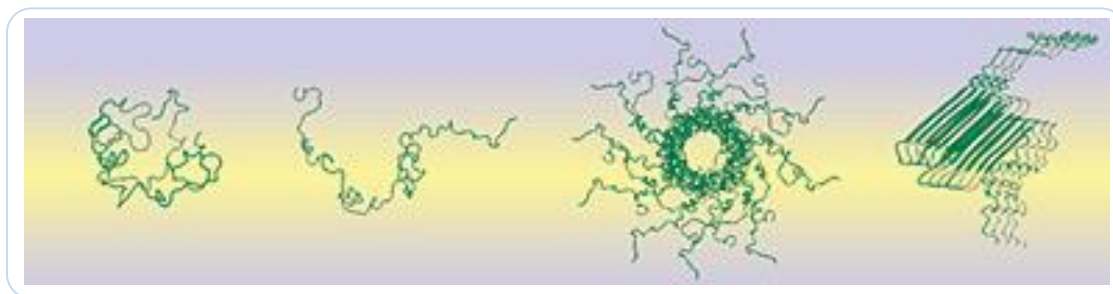
Funkcje ASN nie są w pełni poznane, jednak ze względu na jej lokalizację komórkową sugeruje się związek tego białka z transportem synaptycznym, a jej interakcje z białkami cytoszkieletu mogą wskazywać na jej udział w aksonalnym transporcie pęcherzyków synaptycznych [57]. Wykazano, że ASN może wpływać na wielkość pęcherzyków synaptycznych poprzez modulację metabolizmu lipidów i zapobieganie ich hydrolizie do zasady i kwasu fosfatydowego, odpowiedzialnego za tworzenie pęcherzyków synaptycznych z błon komórkowych. Wykazano również, że ASN reguluje czynność pęcherzyków synaptycznych przez wiązanie i transport kwasów tłuszczowych [58,59], a także bierze udział w przemianach fosfolipidów błonowych poprzez hamowanie aktywności fosfolipazy D2 (ang. *phospholipase D2*, PLD2) [58]. Istnieją również doniesienia wskazujące na udział ASN w procesie różnicowania i przeżywalności neuronów dopaminergicznych myszy oraz komórek progenitorowych człowieka [60,61], jak również na antyapoptyczne działanie ASN [62,63].

Ponadto wiadomo, że ASN może ulegać degradacji przy udziale układu ubikwityna-proteasom lub alternatywnie na drodze lizosomalnej autofagii oraz rozkładowi przez cytoplazmatyczne proteazy m.in. kapaniny I [64]. Zaburzenia w strukturze i funkcji ASN obserwowane są w szeregu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak: chP, atrofia wielosystemowa, MSA, czy choroba otępienna z ciałami Lewy'ego, nazwanych wspólnie  $\alpha$ -synukleinopatiami.



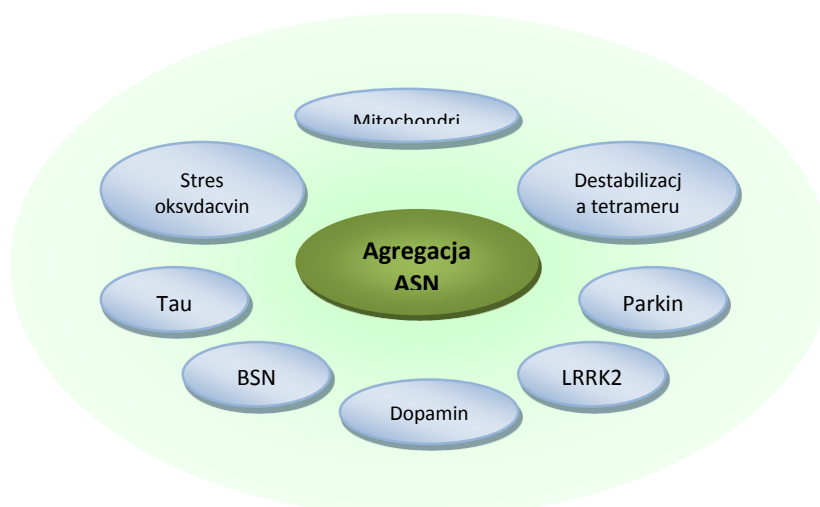
### 1.9.2. CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA AGREGACJĘ ALFA-SYNUKLEINY W CHOROBIE PARKINSONA

Zaburzenia w strukturze ASN ( $\beta$ -harmonijka) obserwowane w przebiegu chP mogą prowadzić do jej agregacji i tworzenia rozpuszczalnych oligomerów, a następnie nierozpuszczalnych filamentów i złogów w obrębie komórek nerwowych w postaci LB i neurytów Lewy'ego (Ryc. 13) [65].



Ryc. 13. Etapy agregacji alfa-synukleiny [66].

Nie podlega wątpliwości, że proces agregacji ASN jest zjawiskiem niekorzystnym dla komórek nerwowych nie tylko ze względu na dużą toksyczność powstających agregatów, ale również z powodu zaburzenia funkcji fizjologicznych ASN spowodowanych obniżeniem jej biodostępności [67]. Wykazano, że proces agregacji ASN w chP może być modulowany przez wiele czynników m.in. przez stres oksydacyjny, inne białka neuronalne, parkinę, neuroprzekaźniki katecholaminowe, a szczególnie DA oraz mutacje w genie *SNCA*. Wydaje się również, że wpływ na proces agregacji ASN mogą mieć czynniki prowadzące do destabilizacji tetramerów ASN (Ryc. 14).



Ryc. 14. Czynniki wpływające na agregację alfa-synukleiny.

ASN- alfa-synukleina, BSN- beta-synukleina, LRRK2 (ang. *Leucine Repeat Rich Kinase 2*).

### 1.9.3. MUTACJE W GENIE KODUJĄCYM ALFA-SYNUKLEINĘ, A PROCES AGREGACJI ASN

Gen *SNCA* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 4 (4q21.3-22). Pierwszą z opisanych mutacji punktowych genu *SNCA* warunkujących ujawnienie się chP była transwersja G na A w pozycji 209 eksonu 4 powodująca zamianę alaniny (A) na treoninę (T) w pozycji 53 białka ASN [68].

Co ciekawe, ewolucyjnie konserwowany gen *SNCA* u myszy, szczura oraz kanarka fizjologicznie zawiera T zamiast A w pozycji 53 kodonu, których zamiana u ludzi prowadzi do ujawnienia się chP. Już pierwsze doniesienia literaturowe opisujące przypadek sycylijskiej rodziny Contrusi, w której występowała RchP wywołana mutacją A53T *SNCA* wskazywały na szybszy postęp choroby i wczesny jej początek. Większość członków rodziny Contrusi z mutacją A53T *SNCA* dotkniętych chP przejawiała jednostronne drżenie spoczynkowe, zaburzenia postawy i chodu, spowolnienie ruchowe oraz sztywność mięśni. Często dochodziło u nich do rozwoju cech otępienia (z różnym nasileniem). Chorzy dobrze reagowali na terapię L-dopą, ale występowały u nich liczne dyskinezy [68].

Kolejną mutacją punktową genu *SNCA* była zidentyfikowana w niemieckiej rodzinie transwersja G>C w pozycji 88 w eksonie 3 prowadząca do zamiany A na prolinę (P) w pozycji 30 białka ASN. Jak wykazano, w wyniku tej mutacji ASN została pozbawiona zdolności łączenia się N-kończową domeną z błoną pęcherzyków synaptycznych przenoszonych szybkim transportem aksonalnym, prowadząc do zmiany lokalizacji ASN w komórce. Choroba Parkinsona wywołana mutacją A30P *SNCA* wiązała się ze stosunkowo wczesnym wiekiem ujawnienia choroby i charakteryzowała się nieco łagodniejszym przebiegiem w porównaniu z chorymi z mutacją A53T *SNCA* [69]. W przypadku obu mutacji opisywano dużą zmienność objawów w obrębie poszczególnych rodzin [68,69].

Opisano również trzecią mutację punktową genu *SNCA* wywołującą zamianę kwasu glutaminowego (E) na lizynę (K) w pozycji 46 białka [70]. Jak wykazano, mutacja E46K *SNCA*, zmieniając polaryzację ASN, wpływa na występowanie znacznych zmian fizykochemicznych i molekularnych w obrębie tego białka. Sugeruje się również, iż mutacja E46K *SNCA*, poprzez modyfikację wiązania z fosfolipidami błon komórkowych, może zaburzać uwalnianie neurotransmiterów, również katecholamin, oraz powodować bardziej efektywną agregację ASN w porównaniu z mutacjami A53T i A30P [71]. W obrazie klinicznym chorych z mutacją E46K *SNCA* obserwowano nie tylko zaburzenia motoryczne i cechy otępienia, ale również halucynacje

wzrokowe [70]. Jak wynika z najnowszych doniesień, u chorych z mutacją E46K *SNCA* zaburzenia neuropsychologiczne pojawiają się na wczesnym etapie choroby i mogą stanowić odrębną cechę zaburzeń poznawczych [72].

Wykazano, że agregacja ASN może być wywołana nie tylko mutacjami punktowymi genu *SNCA*, ale również duplikacją czy triplikacją tego genu. Ponadto, wykazano, że triplikacja genu *SNCA* prowadzi do dwukrotnego zwiększenia poziomu ASN, natomiast duplikacja podnosi poziom tego białka półtorakrotnie [73]. Obecnie wiadomo, że triplikacja genu *SNCA* związana jest z występowaniem WchP o szybkim postępie choroby, w przebiegu, której często dochodzi do rozwoju otępienia i zaburzeń układu autonomicznego [74]. Z kolei, chP wywołana duplikacją genu *SNCA* ujawnia się nieco później, rozwija powoli, bez cech otępienia i charakteryzuje obrazem klinicznym podobnym do SchP [75].

Obecnie uważa się również, że występująca u chorych z chP warunkowaną triplikacją genu *SNCA*, hipotonia ortostatyczna, której nie opisywano w przypadkach duplikacji genu prawdopodobnie może być związana z zaburzeniami powstawania pęcherzyków synaptycznych i zachodzącej w nich biosyntezy noradrenaliny i adrenaliny wywołanej dysfunkcją ASN [74,75]. Hipoteza ta, wydaje się tłumaczyć wyniki szeregu badań patomorfologicznych, w których wykazano, iż w przebiegu chP dochodzi nie tylko do zaniku neuronów dopaminergicznych, ale także do utraty zakończeń noradrenergicznych, również w obrębie układu sympatycznego serca [76,77].

Z doniesień piśmiennictwa wynika, że pojawienie się każdej dodatkowej kopii genu *SNCA* może wpływać na okres ujawnienia się chP i skutkować nasileniem objawów klinicznych. Pojawiły się również doniesienia wskazujące na szybszy postęp chP u chorych z duplikacją genu *SNCA* z włoskiej rodziny, u których obserwowano wcześniejszy początek choroby (ok. 40 r.ż.), jak również szybki postęp z wczesnymi fluktuacjami i dyskinezami oraz rozwijającymi się cechami otępienia [78]. W 2008 roku opisano również przypadek chorego z chP z duplikacją *SNCA* nie odpowiadającego na leczenie L-dopą, u którego choroba postępowała bardzo szybko (do stopnia 5 w skali Hoehn-Yahra w ciągu kilku lat) [79]. Z drugiej strony, w kilku rodzinach z duplikacją *SNCA* opisywano także przypadki bezobjawowych nosicieli mutacji, u których nie wykazano żadnych zmian przedklinicznych również w obrazie PET, czy zaburzeń węchu. Te doniesienia wskazują na zmienną penetrację duplikacji *SNCA*, dla której współczynnik wynosi ok. 30-40% [80]. Uważa się, że prawdopodobnie zmienna penetracja duplikacji *SNCA* może być związana z udziałem innych czynników genetycznych, bądź środowiskowych [81].

Obecnie wiadomo, że nadekspresja ASN w komórce nerwowej ułatwia procesy agregacji tego białka nawet w przypadku obecności jego prawidłowej struktury. Zaczęto więc podejrzewać, iż nie tylko mutacje w obrębie samego genu *SNCA*, ale być może także inne czynniki wpływające na poziom ekspresji ASN mogą przyczyniać się do ujawnienia się SchP. Badania prowadzone przez Chiba-Falek i wsp. wykazały, że w regionie NACP-Rep1 odcinka promotorowego genu *SNCA*, znajduje się miejsce polimorficzne różniące się liczbą powtórzeń dwunukleotydowych mające wpływ na poziom ekspresji ASN oraz ryzyko wystąpienia chP [82]. Region ten zawiera powtórzenia dwunukleotydowe (TC)<sub>x</sub>(T)<sub>2</sub>(TC)<sub>y</sub>(TA)<sub>2</sub>(CA)<sub>z</sub>, mogące różnić się zarówno liczbą powtórzeń, jak i zawierać zamiany nukleotydów. Udowodniono, iż zmiana długości regionu bardziej niż substytucje, wpływa na regulację ekspresji ASN [83-85]. Dotychczas opisano, jako najczęściej występujące u człowieka, pięć alleli NACP-Rep1 (-1, 0, +1, +2, +3) odcinka promotorowego genu *SNCA*. Najczęściej w populacji europejskiej występował allel +1 regionu NACP-Rep1 promotora *SNCA* [83-85]. Wykazano również, że allel 0 regionu NACP-Rep1 promotora *SNCA* jest o dwie pary zasad krótszy od allelu +1, odpowiednio allel -1, krótszy o 4 pz, a +2 i +3 są dłuższe o 2 i 4 pz. Ponadto, allel +1 regionu NACP-Rep1 genu *SNCA*, zawierający 259 pz, w istotnym stopniu redukuje ryzyko wystąpienia chP w populacji europejskiej i australijskiej. Wykazano również, że obecność genotypu +1/+1 NACP-Rep1 *SNCA* związana jest z niższym poziomem ASN we krwi u chorych z chP w porównaniu z genotypami +2/+2, +1/+2 oraz +1/+3 tego regionu [83,84].

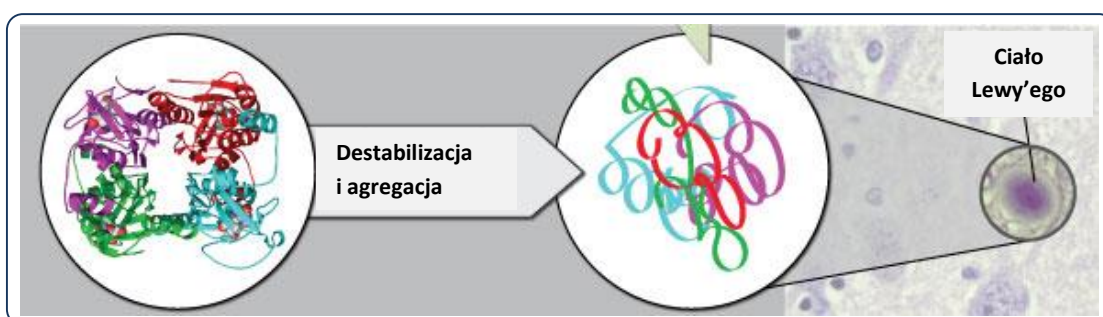
Obecnie uważa się, że na proces agregacji ASN u chorych z chP mogą również wpływać czynniki takie jak: alternatywny splicing, fosforylacja czy czynniki modyfikujące ekspresję genu *SNCA*. Jednak znaczenie wymienionych czynników nie zostało dotychczas w pełni potwierdzone. Wydaje się, że dokładne zbadanie genotypów regionu NACP-Rep1 odcinka promotorowego genu *SNCA* może nie tylko pomóc w wyjaśnieniu patogenezy chP, ale również ułatwić wczesną diagnostykę i określić stopień ryzyka zachorowania na tę chorobę zwyrodnieniową.

Dotychczasowe doniesienia literaturowe wskazują na zróżnicowany rozkład genetyczny poszczególnych genotypów w zależności od regionu geograficznego i badanej populacji. Ponadto często przynoszą rozbieżne wyniki. O ile ochronne działanie allelu +1 raczej nie podlega obecnie dyskusjom, o tyle dla alleli 0, +2 i +3 sugerowano zarówno brak wpływu, jak i zwiększanie ryzyka ujawnienia się chP, a nawet niekiedy działanie ochronne [86-89]. Jak do tej pory badania odcinka NACP-Rep1 regionu promotorowego genu *SNCA* w populacji polskiej nie były prowadzone.

#### 1.9.4. ZNACZENIE STABILNOŚCI STRUKTURY TETRAMERÓW

##### ALFA-SYNUKLEINY DLA PROCESU JEJ AGREGACJI

Autorzy opublikowanego w 2011 roku w *Nature* rewolucyjnego odkrycia, wykazali, że proces agregacji ASN musi być poprzedzony rozpadem tetramerów do łatwo ulegających agregacji monomerów tego białka oraz że same tetramery ASN w ogóle lub w niewielkim stopniu ulegają agregacji. Autorzy pracy sugerują również, że w proces agregacji ASN mogą być zaangażowane nowe, nieznane jeszcze czynniki wpływające m.in. na destabilizację struktury tetrameru ASN (Ryc. 15) [53].



Ryc. 15. Znaczenie destabilizacji struktury tetrameru alfa-synukleiny w zapoczątkowaniu procesów jej agregacji [90].

#### 1.9.5. PATOLOGICZNE BIAŁKA NEURONALNE,

##### A AGREGACJA ALFA-SYNUKLEINY

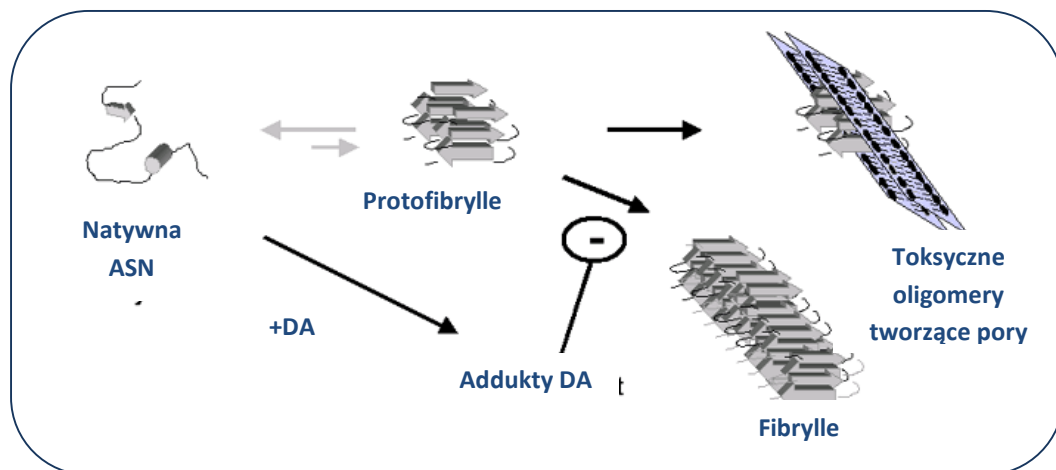
Sugeruje się, że ASN ulega interakcji z białkiem tau oraz amyloidogennym białkiem  $\beta$ -amyloidu (ang. *amyloid beta*, A $\beta$ ). Jak wykazano w badaniach na modelu doświadczalnym chP - myszach transgenicznym z nadekspresją ASN, białko tau i ASN mogą na siebie wzajemnie oddziaływać prowadząc do synergistycznej indukcji fibrylizacji zarówno ASN, jak i białka tau [91]. Z kolei na modelach doświadczalnych zarówno chP, jak i chA (myszy transgeniczne z ekspresją ludzkiej ASN i A $\beta$ ), wykazano, że ASN może działać jako „zarodek nukleacji” zarówno dla samej siebie, jak i dla A $\beta$  [92]. Z drugiej strony białka nieamyloidogenne, takie jak  $\beta$ -synukleina (ang. *beta-synuclein*, BSN), najprawdopodobniej chronią ASN przed jej agregacją, co zostało potwierdzone w badaniach na myszach transgenicznym z ekspresją ludzkiej ASN i BSN [93].

### 1.9.6. WZAJEMNE ODDZIAŁYWANIE DOPAMINY I ALFA-SYNUKLEINY

Wykazano, że fizjologicznie ASN może modulować biosyntezę katecholamin na drodze obniżenia ekspresji hydroksylazy tyrozynowej (ang. *tyrosine hydroxylase*, HT) na poziomie białka oraz obniżenia ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nurr1 inicjującego transkrypcję genu *HT*, jak również obniżenia ekspresji innych genów zaangażowanych w syntezę DA [94]. Jak wskazują badania przeprowadzone *in vitro* oraz na komórkach mózgu myszy i szczurów, ASN może prowadzić do obniżenia aktywności HT, przez wiązanie się z nieufosforylowaną (nieaktywną) formą HT i zwiększenie jej stabilności. Z kolei obniżenie aktywności HT może wpływać na zahamowanie biosyntezy DA [95,96].

W mózgu poziom DA jest kontrolowany na drodze metabolizmu w obrębie przestrzeni synaptycznej. Jednakże DA może również wracać do komórki za pośrednictwem transportera DA (ang. *dopamine transporter*, DAT), gdzie zostaje „zamknięta” w pęcherzykach synaptycznych [97,98]. Sugeruje się, że ASN hamuje aktywność DAT wpływając na szybkość wychwytu DA nie zaś na jego powinowactwo do DA [99].

Z drugiej strony, katecholaminy, a szczególnie DA, mogą modulować oligomeryzację ASN w komórkach linii PC12 z nadekspresją ASN [100]. Wykazano także, iż produkty utleniania DA wpływają na agregację ASN *in vitro*, oraz że proces ten zależy od pH środowiska [100]. Ponadto w badaniach Da Costa i wsp. przeprowadzonych na komórkach nerwowych linii TSM1, 6-hydroksydopamina wywołując nasiloną agregację ASN może na drodze zmniejszenia biodostępności tego białka hamować jej działanie antyapoptotyczne [102]. Natomiast badania prowadzone w komórkach linii PC12 z nadekspresją ASN wskazują, że DA i jej utlenione pochodne powodują zahamowanie agregacji ASN na poziomie oligomerów (protofibryli) i zapobiegają jej dalszej fibrylizacji (Ryc. 16) [100].



Ryc. 16. Wpływ dopaminy na wzrost neurotoksyczności alfa-synukleiny [103].

ASN- alfa-synukleina, DA- dopamina

Ponadto wykazano, że pomiędzy DA, a ASN może dochodzić do interakcji prowadzącej do utleniania czterech metionin (M) zawartych w regionach C- i N-końca ASN. Postuluje się, iż proces ten jest głównym mechanizmem generującym tworzenie oligomerów ASN zapobiegających łączeniu się monomerów ASN na zasadzie koniec do końca charakterystycznych dla procesu formowania się nierozpuszczalnych fibrylli [69]. Natomiast w badaniach prowadzonych zarówno na *Drosophila*, jak i na mysim i szczurzym modelu chP, wykazano, że DA hamuje fibrylizację ASN także przez tworzenie adduktów i stabilizację protofibrylli niezdolnych do dalszej agregacji i tworzenia fibryli [67]. Ponadto, wykazano, że dopaminochrom, produkt oksydacji DA *in vitro*, hamuje fibrylizację ASN wchodząc w interakcję ze specyficznym regionem C-końca białka i indukując tworzenie sferycznych oligomerów ASN, które nie ulegają dalszej fibrylizacji na skutek zmian konformacji ASN [104].

Mimo, że przez wiele lat utrzymywał się pogląd, iż odkładanie się złogów ASN w postaci LB jest główną przyczyną zmian neurodegeneracyjnych m.in. w chP, obecnie postuluje się, iż LB są formą agresomów i mogą pełnić rolę neuroprotekcijną poprzez odłączanie nieprawidłowych białek oraz zapobieganie ich interakcji z innymi składnikami komórek [105]. Co więcej, obecnie raczej protofibryle uważa się za wysoce neurotoksyczne, gdyż posiadają one zwiększone powinowactwo do fosfolipidów błon pęcherzyków synaptycznych, i w konsekwencji przyjmują strukturę  $\beta$ -harmonijki tworząc w ich błonie pory, przez które DA i związki toksyczne wydostają się do cytoplazmy [105].

Biorąc pod uwagę liczne interakcje między ASN i DA wydaje się oczywistym, że inne czynniki wpływające na poziom DA w komórce mogą pośrednio modulować również procesy agregacji ASN. Uważa się, że jednym z takich czynników może być reduktaza sepiapteryny (ang. *sepiapterin reductase*, SR).

#### *1.9.6.1. WPŁYW REDUKTAZY SEPIAPTERYNY NA REGULACJĘ POZIOMU DOPAMINY I ROZWÓJ CHOROBY PARKINSONA*

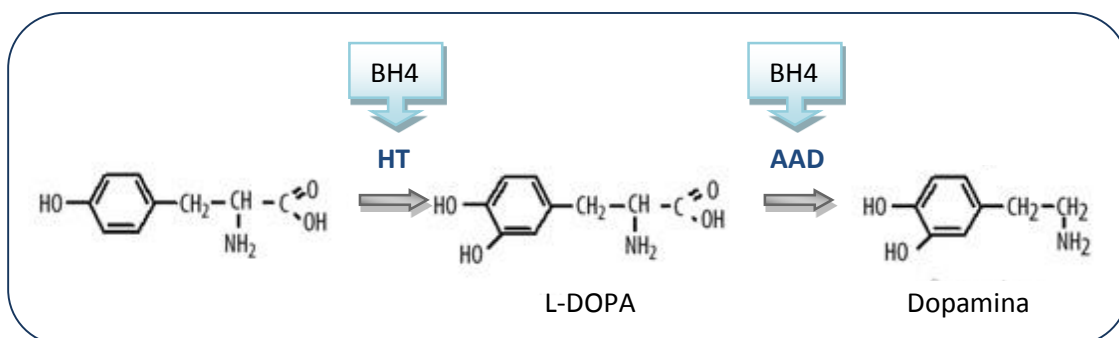
Reduktaza sepiapteryny należy do grupy aldo-ketoreduktaz, katalizujących redukcję pochodnych pteryn. Białko SR kodowane przez gen *SPR* (ang. *sepiapterin reductase gene*) zbudowane jest z 261 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej 28,047 Da [106]. W komórce występuje w formie monomeru i ulega aktywacji po utworzeniu homodimeru (Ryc. 17) [107,108].



Ryc. 17. Model budowy reduktazy sepiapteryny [108].

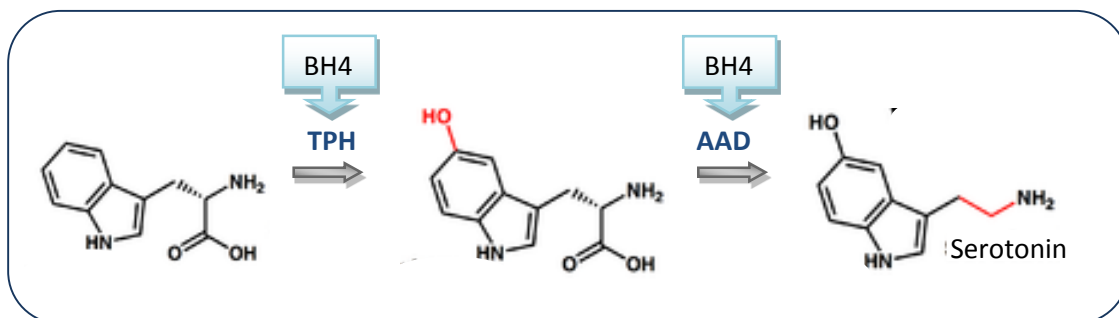
Wykazano, że białko SR ulega również fosforylacji w miejscu S213 z udziałem zależnej od jonów Ca<sup>2+</sup> kinaz białkowych i w tej formie podlega degradacji wskutek zwiększonej podatności na działanie proteaz [109,110].

Ponadto SR jest zaangażowana w regulację poziomu DA i serotoniny (5-hydroksytryptamina, 5-HT), poprzez jej udział w biosyntezie tetrahydrobiopteryny (ang. *tetrahydrobiopterin*, BH4) dekarboksylazy aminokwasów aromatycznych (ang. *amino acid decarboxylase*, AADC), hydroksylazy tryptofanu (ang. *tryptophane hydroxylase*, TPH) oraz HT – enzymów zaangażowanych w syntezę amin biogennych (Ryc. 18 i 19).



Ryc. 18. Udział tetrahydrobiopteryny w biosyntezie dopaminy.

BH4 – tetrahydrobiopteryna, HT- hydroksylaza tyrozyny, AADC – dekarboksylaza aminokwasów aromatycznych.



Ryc. 19. Udział tetrahydrobiopteryny w biosyntezie serotoniny.

BH4 – tetrahydrobiopteryna, TPH - hydrolaza tryptofany, AADC – dekarboksylaza aminokwasów aromatycznych.



## 1.9.6.2. GEN REDUKTAZY SEPIAPTERYNY A PATOGENEZA CHOROBY PARKINSONA

Gen *SPR* jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu 2 w regionie 2p14-p12 i składa się z 3 eksonów [107].

W 2001 roku Bonafe i wsp. po raz pierwszy przedstawili opis dwóch chorych z wywołaną niedoborem SR dystonią odpowiadającą na leczenie L-dopą wraz z postępującym opóźnieniem psychoruchowym [111]. U opisywanych chorych występowały obok obniżonego poziomu SR niedobory zarówno 5-HT, jak i DA. Obniżony poziom 5-HT wykazano również w chorobie afektywnej dwubiegunowej z dysfunkcją SR [112].

Ponadto, wykazano, że u obu chorych z dystonią niski poziom SR był warunkowany obecnością mutacji w genie *SPR* (Tab. 3). Przypadki dystonii warunkowanej mutacjami w genie *SPR* zostały w późniejszym czasie opisane również przez Steinbergera [113] i Bikkera [114].

Tab. 3. Mutacje genu *SPR* związane z występowaniem dystonii

Nr.	Mutacja	dbSNP	Zamiana aminokwasu	Homozygota/heterozygota	Fenotyp	Źródło
1.	c.354-355 TC>CT; g.1303-1304 TC>CT	-	Q119T	homozygota	Odpowiadająca na terapię L-dopą dystonia wywołana niedoborem SR	[111]
2.	5bp del 1397-1401	-	-	heterozygota	Odpowiadająca na terapię L-dopą dystonia wywołana niedoborem SR	[111]
3.	448A>G	rs104893665	R150G	homozygota	Odpowiadająca na terapię L-dopą dystonia wywołana niedoborem SR	[115]
4.	-13G>A	-	-	heterozygota	Odpowiadająca na terapię L-dopą dystonia wywołana niedoborem SR	[113]
5.	1437C>T	-	P163L	homozygota	Odpowiadająca na terapię L-dopą dystonia wywołana niedoborem SR	[116]
6.	751A>T	rs104893666	K251T	homozygota	Odpowiadająca na terapię L-dopą dystonia wywołana niedoborem SR	[117]

SR- reduktaza sepiapteryny (ang. *sepiapterin reductase*).

Równolegle do badań prowadzonych nad zaburzeniami poziomu SR w dystonii, prowadzono poszukiwania związku pomiędzy genem *SPR* a chP. Inspiracją do tych badań było odkrycie w 1998 roku locus PARK3 w regionie 2p13 obejmującym m.in. gen *SPR* [118]. Jednak badania prowadzone przez West i wsp. nie potwierdziły genu *SPR* jako kandydata dla tego locus [119].

W 2006 roku wskazano na związek polimorfizmów DNA w regionie obejmującym gen *SPR* zarówno z RchP – PARK3, jak i SchP [120]. DeStefano oraz Karamohamed i wsp. wykazali również zależność pomiędzy wiekiem zachorowania na chP, a występowaniem polimorfizmów w regionie otaczającym gen *SPR* [121,122]. Ponadto w badaniach Tobin i wsp. wykazano istotnie wyższą ekspresję genu *SPR* u chorych z chP w porównaniu do osób kontrolnych [123].

Najnowsze badania wielopopulacyjne Sharma i wsp. nie wykazały jednak związku pomiędzy polimorfizmami w obrębie genu *SPR* (rs1396107, rs1567230, rs2421095, rs1876487 i rs1561244), a zwiększonym ryzykiem zachorowania na chP. Autorzy wskazali natomiast na prawdopodobny związek pomiędzy badanymi polimorfizmami genu *SPR*, a ujawnieniem się chP szczególnie w populacji północnoeuropejskiej [124].

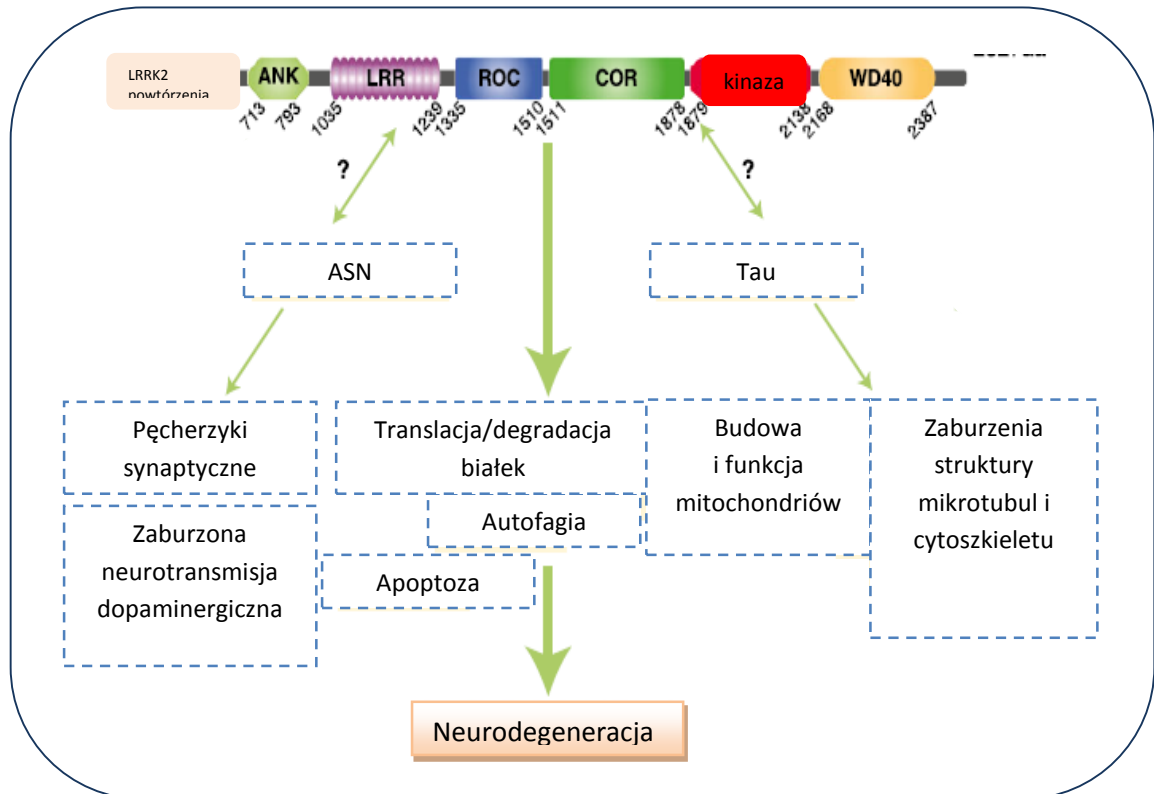
Jak do tej pory nie prowadzono badań obejmujących analizę występowania mutacji w obrębie kodonu 213 genu *SPR*, kodującego jedyne miejsce fosforylacji SR (S213), zaangażowanej w procesy biosyntezy amin biogennych wpływających na zaburzenia struktury ASN w chP.

#### 1.9.7. WPLYW KINAZY LRRK2 NA PROCES AGREGACJI ASN

Kinaza LRRK2 (ang. *leucine-rich repeat kinase-2*, LRRK2) nazywana również dardaryną od słowa ”*dardara*” oznaczającego w języku Basków *drzenie*. To właśnie w populacji Basków po raz pierwszy opisano mutacje w genie *LRRK2* kodującym dardarynę, jako przyczynę RchP – PARK8.

Białko LRRK2 jest zbudowane z 2527 aminokwasów i kilku domen: domeny wiążącej białko-białko typu LRR i WD40 [125], domeny enzymatycznej Ras kompleksu GTP-azy oraz domeny kinazy białkowej, połączonych domeną COR [126]. Uważa się, że LRRK2 zlokalizowana w obrębie cytoplazmy jest odpowiedzialna za fosforylację białek, takich jak: ASN czy białko tau [127]. Uważa się również, że LRRK2 związana ze strukturami błonowymi m.in. z zewnętrzną błoną mitochondriów i pęcherzykami synaptycznymi może być zaangażowana w transport pęcherzykowy oraz obrót białek w komórce, a także w prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów. Ponadto wykazano,

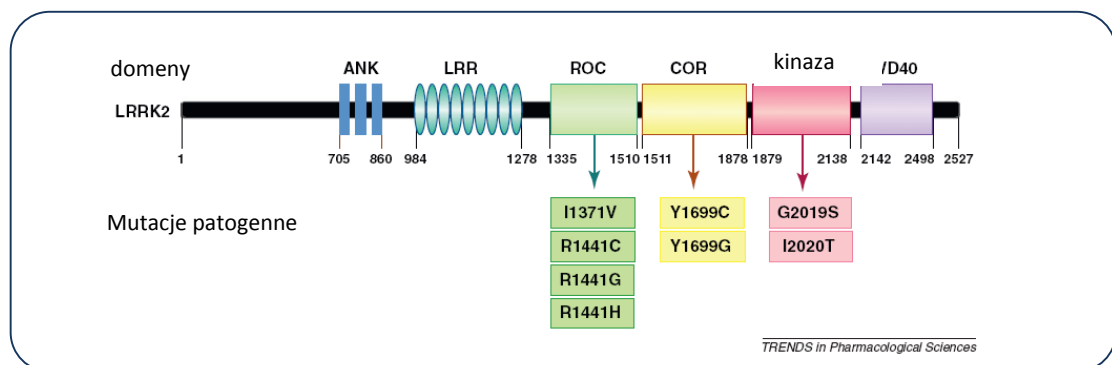
że nadekspresja LRRK2 lub synergizm z ASN może nasilać procesy destrukcyjne w chP (Ryc. 20) [128].



Ryc. 20. Schemat budowy białka LRRK2 oraz jego sugerowane funkcje w neuronie [129].

### 1.9.7.1. UDZIAŁ MUTACJI LRRK2 (PARK8) W PATOGENEZIE CHOROBY PARKINSONA

Gen *LRRK2* jest zlokalizowany na chromosomie 12 w lokus 12p11.2-q13.1 i składa się z 51 eksonów [130,131]. Jak do tej pory opisano ponad 40 mutacji genu *LRRK2* zarówno w RchP, jak SchP (Ryc 21). W przypadku SchP, wykazano ich występowanie ze zmienną częstością 0,4-1,9% w zależności od badanej populacji [132-134].



Ryc. 21. Budowa oraz lokalizacja mutacji patogenicznych w obrębie genu *LRRK2* [135].

Z danych piśmiennictwa wynika, że chorzy z chP z mutacją punktową w genie *LRRK2* charakteryzują się późnym początkiem choroby, dobrą odpowiedzią na terapię L-dopą oraz obrazem choroby podobnym do przebiegu SchP [136]. Niekiedy u tych chorych obserwuje się występowanie cech otępienia oraz zaburzeń w układzie autonomicznym [137].

Ponadto, wykazano, że najczęściej występującą mutacją w genie *LRRK2* jest G2019S. Mutacja ta jest przyczyną autosomalnie dominującej chP i występuje z 10-18% częstością w populacji Żydów Aszkenezyjskich, oraz z 3-13% w populacji europejskiej [132,138,139]. Jednakże, badania Białecka i wsp. prowadzone u chorych z chP w populacji polskiej nie wykazały obecności żadnej z oznaczonych mutacji w genie *LRRK2* [140].

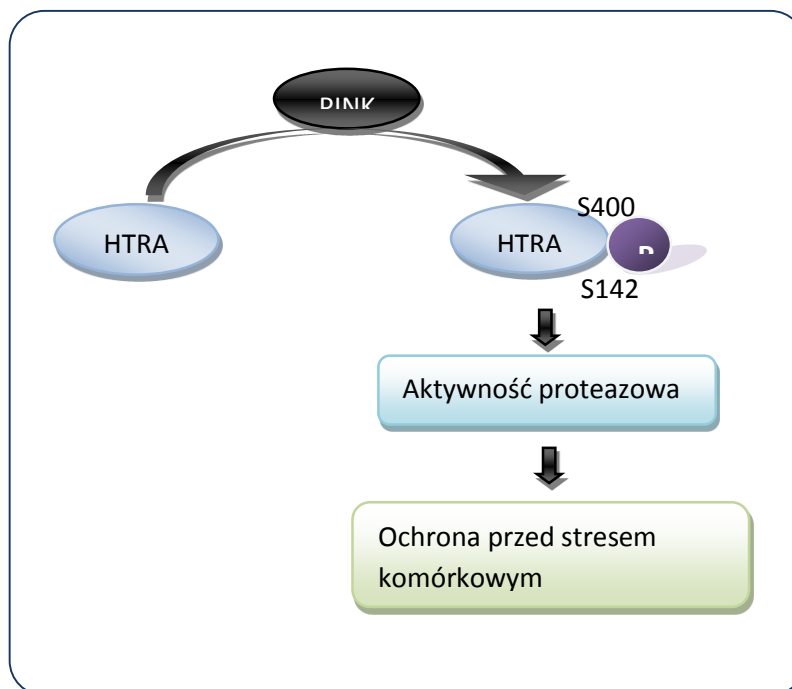
Mutacje w genie *LRRK2* mogą prowadzić do nieprawidłowości w budowie białka *LRRK2* które wraz z parkiną i białkiem: HTRA2 (ang. *high temperature requirement protein*) jest odpowiedzialne za utrzymanie prawidłowej funkcji mitochondriów.

#### 1.9.8. BIAŁKO HTRA2 – BUDOWA I FUNKCJE

Białko HTRA2 określane również, jako Omi jest enzymem zlokalizowanym w obrębie mitochondrialnej przestrzeni międzymbłonowej [141].

Białko HTRA2 kodowane przez gen *HTRA2* jest zbudowane z 458 aminokwasów i wykazuje najwyższą ekspresję w obrębie mięśnia sercowego, mięśni szkieletowych oraz mózgu, ze zróżnicowanym poziomem w obrębie poszczególnych jego regionów [142]. Jak wykazano, białko HTRA2 ulega fosforylacji (Ruc. 2) i aktywacji z udziałem białka PINK1 (ang. *PTEN induced putative kinase 1*) [143].

Pierwsze doniesienia dotyczące związku pomiędzy białkiem HTRA2 i procesem neurodegeneracji pojawiły się w 2000 roku i wskazywały na interakcję tego białka z preseniliną-1 (ang. *preseniline-1*, PS1) [142]. Jednocześnie, badania na modelu zwierzęcym wskazały na udział genu *HTRA2* w warunkowaniu fenotypu zespołu parkinsonowskiego [144], a badania Strauss i wsp. na obecność białka HTRA2 w obrębie LB [145].



Ryc. 22. Aktywacja białka HTRA2 w komórce.

S- seryna, PINK1 (ang. *PTEN induced putative kinase 1*)

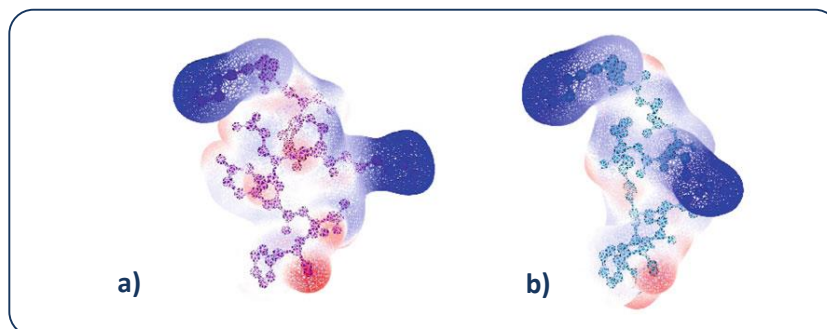
#### 1.9.8.1. UDZIAŁ MUTACJI GENU *HTRA2* (*PARK13*)

##### W PATOGENEZIE CHOROBY PARKINSONA

Gen *HTRA2* jest zlokalizowany na krótkim ramieniu 2 chromosomu w regionie 2p13 i składa się z 8 eksonów [142]. W 2005 roku u chorych z chP w populacji niemieckiej oznaczono pierwsze mutacje genu *HTRA2*: G399S z 0,8% oraz A141S z 6,2% częstością występowania. Jednakże badania Simon-Sanchez i Singleton na populacji Ameryki Południowej podobnie, jak Ross i wsp. w populacji amerykańskiej nie potwierdziły ich występowania. [146,147].

Kolejną opisaną mutacją w genie *HTRA2* była mutacja P143A, zidentyfikowana w populacji Tajwanu zarówno we WchP, jak i w późnej chP (PchP), prowadząca do zaburzenia struktury białka HTRA2 (Ryc. 23) [148]. Ponadto w populacji Tajwanu u jednego chorego z chP zidentyfikowano także mutację c.906 + 3 G>A w regionie niekodującym genu *HTRA2*.

Chorzy z wymienionymi mutacjami w genie *HTRA2* prezentowali typowy obraz kliniczny dla chP: spowolnienie ruchowe, drżenie spoczynkowe oraz sztywność mięśni. Natomiast nie obserwowano u tych chorych cech otępienia, zaburzeń psychiatrycznych, ataksji mózdkowej i szybkiego postępu choroby [148].



Ryc. 23. Zmiana struktury białka HTRA2 wywołana mutacją P143A [148].

Kilka lat później, u chorego ze SchP w populacji belgijskiej opisano występowanie kolejnej mutacji genu *HTRA2*, R404W c.1210 C>T [149]. Natomiast w badaniach na populacji chińskiej, wykazano u jednego chorego z chP obecność mutacji G77A *HTRA2* oraz u sześciu chorych z chP i jednej osoby kontrolnej IVS5+29T>A *HTRA2* (Tab. 4) [150].

Tab. 4. Dotychczas opisane mutacje genu *HTRA2*

Nr	Fenotyp	Zmiana aminokwasu	dbSNP	Mutacja	Homozygota/heterozygota	Źródło
1	chP PARK13 autosomalnie dominująca	G399S	rs72470545	c.1195 G>A	heterozygota	[145]
2	chP PARK13 podatność	A141S	rs72470544	c.421 G>T	heterozygota	[145]
3	chP PARK13 podatność	P143A	-	c.427 C>G	heterozygota	[148]
4	chP PARK13 podatność	R404W		c.1210 C>T	heterozygota	[149]
5	chP PARK13 podatność	G26E		c.77 G>A	heterozygota	[150]

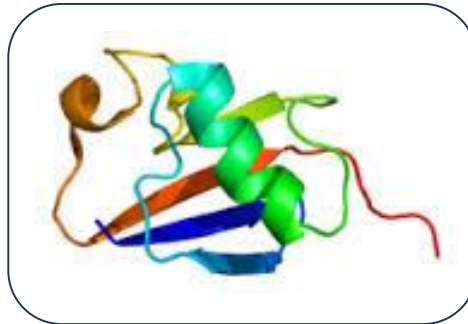
Istnieją również prace wskazujące na brak asocjacji genu *HTRA2* z chP [151]. Poza tym doniesienia piśmiennictwa dotyczące występowania mutacji genu *HTRA2* w chP są rozbieżne. Kruger i wsp. wskazują jednak na konieczność prowadzenia dalszych badań w kierunku poznania roli *HTRA2* w chP z uwzględnieniem różnic populacyjnych. Jak tej pory, badania mutacji w genie *HTRA2* nie były wykonywane w populacji polskiej.

Uważa się, że mutacje genu *HTRA2* przez zmianę struktury białka HTRA2 mogą prowadzić do zaburzeń funkcjonowania mitochondriów podobnie jak inne białka, takie jak LRRK2 czy parkina.

### 1.9.9. UDZIAŁ PARKINY W AGREGACJI ALFA-SYNUKLEINY

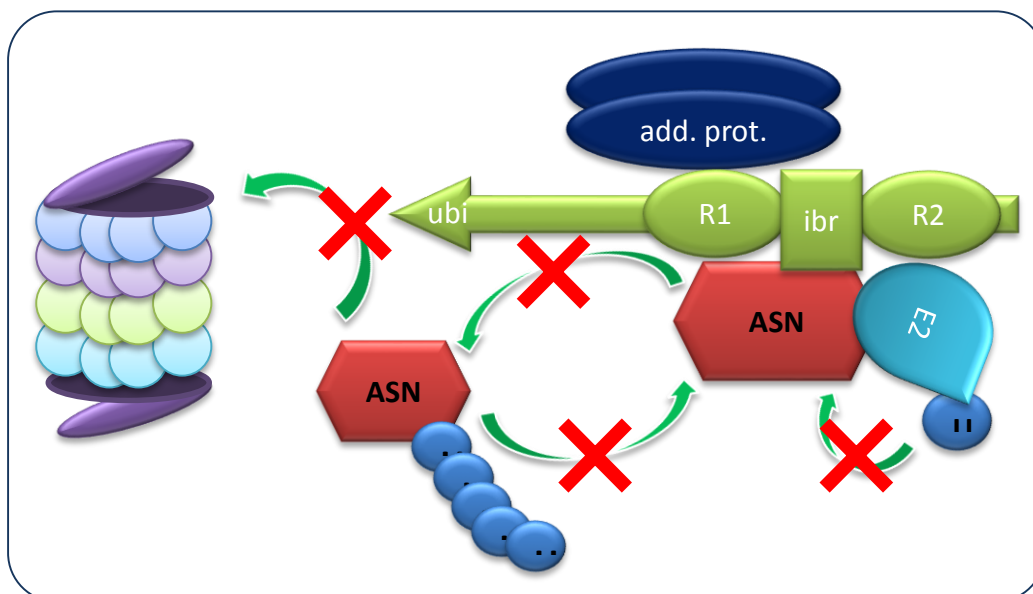
Obecnie uważa się, że istotny wpływ na proces fibrylizacji ASN może wywierać również sprawność funkcjonowania systemu ubikwityna-proteasom. Jak wykazano, zarówno w badaniach na hodowlach komórkowych neuronów, jak i *in vivo*, w zwierzęcym modelu doświadczalnym chP u szczurów, zaburzenia w działaniu tego systemu prowadzą, do nasilenia agregacji ASN na skutek jej nieefektywnej eliminacji. Białkiem o kluczowym znaczeniu dla prawidłowego funkcjonowania systemu ubikwityna-proteasom jest parkina.

Parkina jest białkiem cytoplazmatycznym zbudowanym z 465 aminokwasów, kodowanym przez gen *PRKN*, zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 6 (6q25.2-27), zawierający z 12 eksonów (Ryc. 24) [125].



Ryc. 24. Model budowy białka parkiny.

W budowie parkiny wyróżnia się domenę UPD (ang. *unique parkin domain*), N-kończącą domenę homologiczną z ubikwityną - UBL (ang. *N-terminal ubiquitin-like domain*) oraz C-kończącą domenę z dwoma motywami palca RING (ang. *RING finger motifs*), których obecność może wskazywać na jej potencjalną funkcję regulatorową [152]. Wykazano, że parkina może regulować transkrypcję i replikację DNA mitochondrialnego (mtDNA) w komórkach proliferujących. Parkina funkcjonuje głównie jako ligaza ubikwitynowa E3, stymulując wiązanie białek (przeznaczonych do degradacji w proteasomie) z ubikwityną, zapobiegając także apoptozie komórek (Ryc. 25) [152,153].



Ryc. 25. Rola parkiny w degradacji alfa-synukleiny w proteasomie.

U- ubiquityna, E2 - białko E2, ASN - alfa-synukleina, add.prot. - białka kompleksu parkiny,  
ubi, R1, ibp, R2 - domeny białka parkiny.

Jak wynika z pracy Zhang i wsp., parkina odpowiada również za własną ubiquitylację i degradację w proteasomie [152]. W 2001 roku Shimura i wsp. po raz pierwszy opisali występowanie w mózgu człowieka kompleksu zawierającego parkinę wraz z glikozylowaną formą ASN (alpha-Sp22), wskazując tym samym na zaangażowanie parkiny w procesy degradacji ASN [154]. Ponadto, wykazano, że dysfunkcja parkiny może prowadzić do nieefektywnej eliminacji ASN i do tworzenia się jej złogów. Istnieją także doniesienia wskazujące na zmniejszoną rozpuszczalność zmutowanej parkiny i formowanie przez nią złogów białkowych o charakterze agresomów [155].

Najnowsze badania wykazały, że parkina może odgrywać decyzyjną rolę w „wyborze” między dwoma systemami degradacji: aktywnością proteasomu przez zdolność promowania związanej z proteasomem ubiquitylacji K48 i makroautofagię przez ubiquitylację K63 związaną z sygnalizacją komórkową oraz tworzeniem LB [156].

Obecnie uważa się, że parkina odgrywa również istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu mitochondriów. Większość parkiny zlokalizowana jest w cytoplazmie, jednak część cząsteczek tego białka występuje w obrębie mitochondriów [157], gdzie wiąże się z mtDNA oraz mitochondrialnym czynnikiem transkrypcyjnym A (ang. *mitochondrial transcription factor A*, TFAM) i kontroluje funkcjonowanie mitochondriów wpływając m.in. na transkrypcję i replikację mtDNA [158]. Ponadto, sugeruje się, że parkina może uczestniczyć w kierowaniu nieprawidłowych mitochondriów



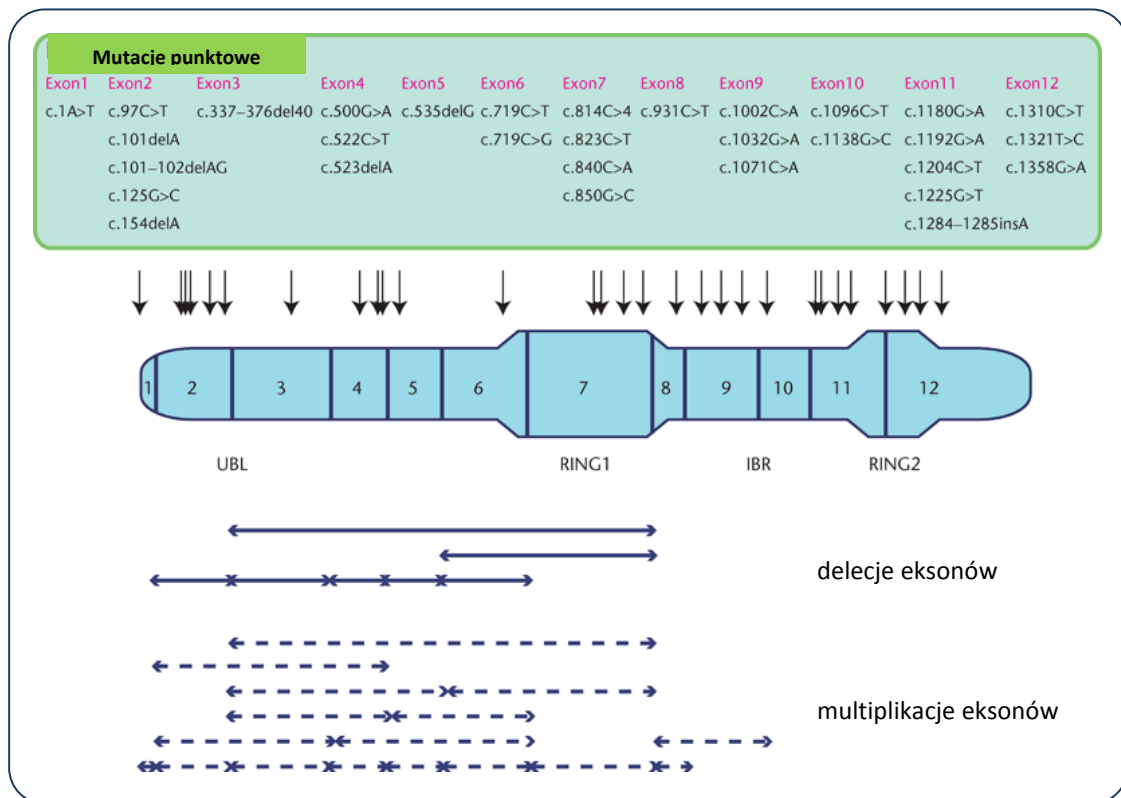
do degradacji w fagosomach, oraz może wpływać na aktywność kompleksu mitochondrialnego, a także pośrednio na poziom stresu oksydacyjnego [158]. Uważa się, że parkina raczej chroni mtDNA przed uszkodzeniami w warunkach stresu oksydacyjnego, a nawet indukuje mechanizmy naprawcze [159].

Ponadto, z doniesień piśmiennictwa wynika, że w komórce nerwowej parkina może również oddziaływać z DA i pośrednio wpływać na agregację ASN [160]. W badaniach na myszach transgenicznym z wyciszonym genem *Gpr37* wykazano, że parkina może regulować stężenie DA zarówno przez modulację aktywności tyrozynazy, jak i regulację procesu degradacji DAT należącego do spektrum substratowego parkiny oraz poprzez oddziaływanie na receptor GPR37. W badaniach prowadzonych na dopaminergicznych komórkach neuroblastomy z nadekspresją parkiny wykazano, że może ona również chronić neurony przed apoptozą indukowaną działaniem DA i jej pochodnymi [161]. Z drugiej strony udowodniono również, że parkina w hodowlach komórkowych szczurzych neuronów podlega działaniu utlenionych pochodnych DA oraz kowalencyjnym modyfikacjom przez DA, prowadzącym do zahamowania jej aktywności [162]. Jednak główną przyczyną dysfunkcji parkiny wydają się być mutacje w genie kodującym to białko (*PRKN*).

#### *1.9.9.1. UDZIAŁ MUTACJI I POLIMORFIZMÓW GENU PRKN (PARK2)*

##### *W PATOGENEZIE CHOROBY PARKINSONA*

Po raz pierwszy mutację genu *PRKN* opisano w japońskiej rodzinie, w której występowała dziedziczona autosomalnie recesywnie MchP [163]. Jak do tej pory zidentyfikowano ponad 100 mutacji genu *PRKN* obejmujących zarówno delecje i insercje jednego lub kilku eksonów, jak i mutacje punktowe prowadzące do zmiany ramki odczytu, przedwczesnej terminacji translacji, czy też substytucji aminokwasów, a prawie połowa opisanych mutacji to mutacje typu missence/nonsense [125,164,165]. Jak wykazano, mutacje w genie *PRKN* są najczęściej występującymi zaburzeniami genetycznymi w rodzinnych przypadkach MchP, chociaż ich obecność wykazano również w chP o późnym początku (PchP, powyżej 40 r.ż.), zarówno w RchP, jak i SchP [166,167,168]. Mimo, że mutacje genu *PRKN* zidentyfikowano we wszystkich 12 eksonach tego genu, do najczęściej występujących należą w eksonach 2, 4, 7, 8, 10 i 11 (Ryc. 26).

Ryc. 26. Lokalizacja wybranych mutacji genu *PRKN* [169].

Ponadto wykazano, że mutacje w genie *PRKN* występują z różną częstością zarówno w rasie kaukaskiej (w tym w 19% w SchP w populacji europejskiej), jak i wśród populacji krajów afrykańskich i azjatyckich [164]. Dane literaturowe dotyczące częstości występowania mutacji *PRKN* i ich zaangażowania w modulację ryzyka zachorowania na chP są bardzo rozbieżne i wykazują duże zróżnicowanie w zależności od badanej populacji, oraz wieku osób włączonych do badań. W populacji włoskiej u chorych z WchP wykazano występowanie mutacji *PRKN* w konfiguracji homozygotycznej lub złożonej heterozygotycznej u 8,2% przypadków oraz heterozygotycznej u 2,7% przypadków [170], podczas gdy w populacji szwedzkiej również u chorych z WchP heterozygotyczna mutacja *PRKN* występowała zaledwie u 1,5% chorych, a postaci homozygotycznej nie wykazano u żadnej z badanych osób [171]. W populacji niemieckiej częstość występowania mutacji *PRKN* wynosiła 9% [172], w populacji brazylijskiej 8% [173], w populacji amerykańskiej osiągała wartości poniżej 4% [174] natomiast w populacji japońskiej sięgała 66% [11]. W populacji polskiej, jak do tej pory przeprowadzono badanie na występowania mutacji (sekwencjonowano cały gen) w genie *PRKN* jedynie u chorych z WchP, które wskazywało na niewielki udział tych mutacji w patogenezie chP [175]. Wyniki te odbiegały od trendów światowych.

## 1.10. INNE SCHORZENIA UKŁADU POZAPIRAMIDOWEGO

Do chorób przebiegających z zaburzeniami układu pozapiramidowego, oprócz chP należą również tzw. parkinsonizmy atypowe nazywane również parkinsonizmem „plus”. Do tych chorób zaliczamy: PSP, zwyrodnienie korowopodstawne (ang. *corticobasal degeneration*, CBD), otępienie z ciałami Lewy'ego (ang. *dementia with Lewy bodies*, DLB) oraz MSA. W ich przebiegu zwykle klasycznemu zespołowi parkinsonowskiemu towarzyszą inne objawy, takie jak: niedowład, spastyczność, otępienie, wyraźne zaburzenia ruchów gałek ocznych, czy funkcji autonomicznych [1,177]. Ponadto, w przypadku parkinsonizmu atypowego rzadziej występują objawy charakterystyczne dla chP, takie jak: drżenie spoczynkowe oraz asymetria objawów występująca od początku i utrzymująca się przez kolejne lata choroby [177].

### **Zanik wieloukładowy**

Zanik wieloukładowy należy do rzadkich chorób neurologicznych, a częstość jego występowania wynosi zaledwie 0,6 przypadków na 100 tys. mieszkańców.

Jest jednostką chorobową, w której występują zaburzenia autonomiczne, objawy zespołu parkinsonowskiego, zespołu mózdkowego oraz piramidowego, z różnym nasileniem i w różnych konfiguracjach (Tab. 5). Obecnie rozróżnia się dwie zasadnicze postaci MSA, przebiegające z dominującymi objawami parkinsonowskimi (ang. *MSA with predominant parkinsonism*, MSA-P) - 80% przypadków i mózdkowymi (ang. *MSA with cerebellar ataxia*, MSA-C) – 20% chorych.

W obrazie neuropatologicznym u chorych z chP wykazano obecność wtrętów cytoplazmatycznych zarówno w oligodendrocytach, jak i w samych neuronach. Wykazano również, że składnikami tych form patologicznych w MSA mogą być zarówno fragmenty organelli komórkowych (np. mitochondria), jak również: ASN, ubikwityna, czy tubulina. Oprócz wtrętów cytoplazmatycznych, w mózgu chorych z MSA, obserwowano zanik komórek nerwowych i glejowych w istocie białej oraz procesy demielinizacji w tym obszarze [1].

Tab. 5. Nasilenie różnych objawów klinicznych w chorobie Parkinsona i zaniku wieloukładowym [1]

Objawy	MSA	ChP
<b>symetria objawów</b>	+++	+
<b>szttywność osiowa</b>	++	++
<b>dystonia kończyn</b>	+	+
<b>niestabilność postawy</b>	++	++
<b>oftalmoplegia</b>	++	+
<b>zespół czolowy</b>	+	+
<b>zaburzenia autonomiczne</b>	++	+

Nasilenie objawów oznaczono od (+) do (+++).

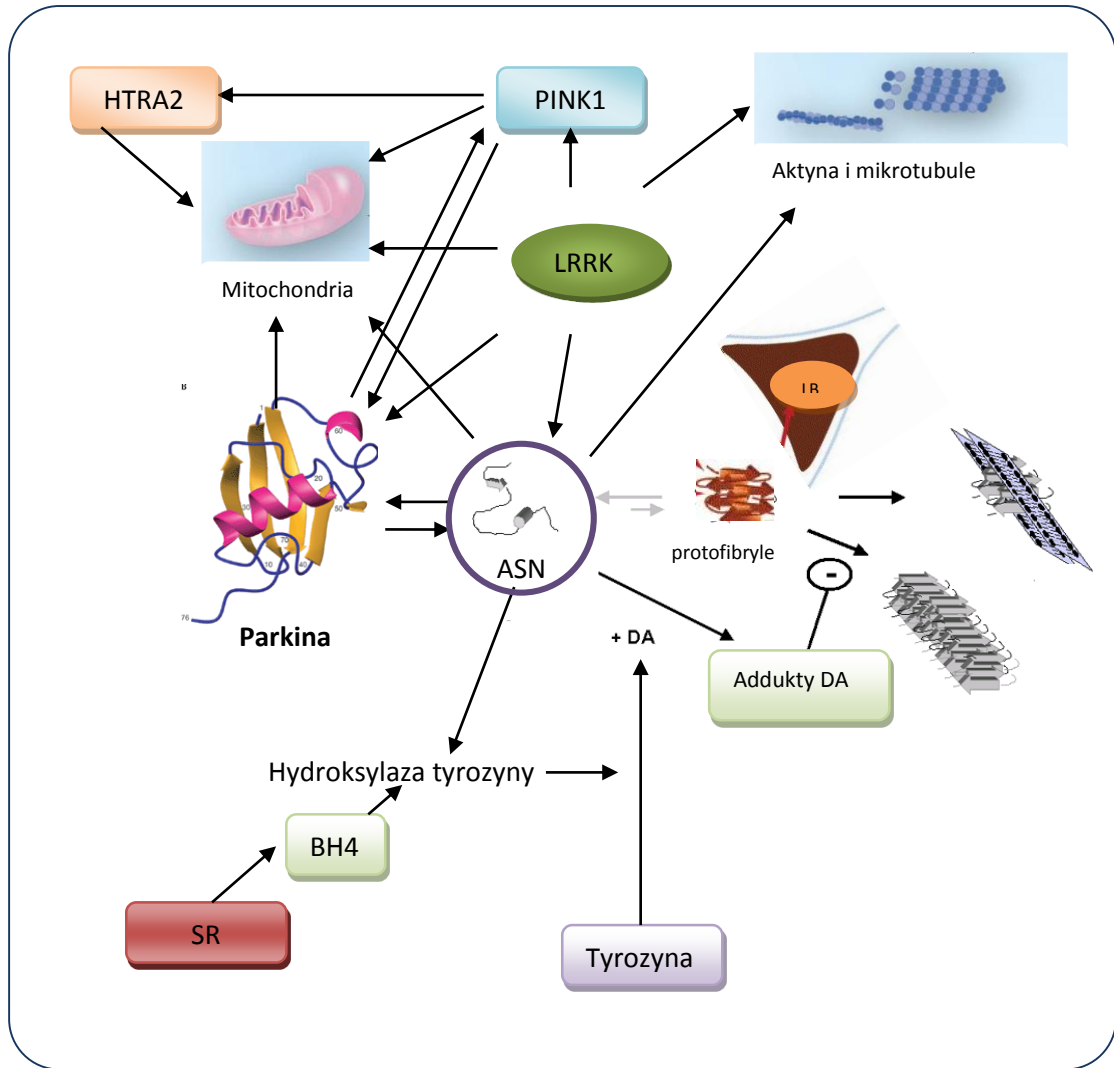
## 1.11. BADANIA GENETYCZNE, A DIAGNOSTYKA

### I TERAPIA CHOROBY PRKINSONA

W związku z potrzebą poszerzenia badań diagnostycznych chorób zwyrodnieniowych ONU, w tym chP, obecnie na świecie prowadzi się szeroko zakrojone badania genetyczne dotyczące poszukiwania mutacji w genach warunkujących wystąpienie procesów prowadzących do degradacji neuronów w określonych strukturach OUN w chP.

Coraz częściej pojawiają się sugestie, że jedną z przyczyn bezpośrednio związanych z ujawnieniem się chP są czynniki genetyczne. Obecnie wiadomo, że szereg genów może być zaangażowanych w modulację ryzyka chP. Niektóre z nich, takie jak: *SNCA* i *PRKN*, zostały dość dobrze poznane, o innych m.in. *SPR* czy *HTRA2* wiadomo wciąż niewiele. Szczególnie mało jest doniesień obejmujących jednoczesną analizę genów PARK (w tym objętych badaniem: *SNCA*, *PRKN*, *LRRK2*, *HTRA2* i *SPR*), których produkty białkowe, takie jak: ASN, parkina, LRRK2, HTRA2, SR, mogą być ze sobą funkcjonalnie powiązane.

Niniejsza praca koncentruje się na pięciu genach: *SNCA*, *PRKN*, *SPR*, *HTRA2* oraz *LRRK2*, wybranych w oparciu o dane literaturowe i wykazane zależności biochemiczne. Prawdopodobne powiązania molekularne między produktami białkowymi wybranych analizowanych genów PARK przedstawiono na rycinie 27.



Ryc. 27. Rola wybranych genów PARK i ich produktów białkowych w patogenezie choroby Parkinsona [64,100,110,128,143,176].

ASN- alfa-synukleina, DA- dopamina, BH4- tetrahydrobiopteryna, SR- reduktaza tetrahydrobiopteryny.

## 2. Cel pracy

Celem pracy była jednoczesna analiza mutacji genów: *SNCA*, *PRKN*, *LRRK2*, *HTRA2* i *SPR* oraz ocena częstości ich występowania u chorych z zaburzeniami układu pozapiramidowego: z rozpoznaną chP, z zespołem parkinsonowskim w przebiegu choroby zwyrodnieniowej, MSA, oraz u kontrolnych ochotników w populacji polskiej.

Uzyskane wyniki badań genetycznych u osób badanych i kontrolnych zostały poddane ocenie statystycznej w celu określenia poziomu ryzyka wystąpienia choroby, związanego z każdą wykrytą mutacją lub polimorfizmem oraz została przeprowadzona analiza interakcji pomiędzy wykrytymi wariantami genetycznymi.

U chorych z chP podjęto również próbę korelacji pomiędzy oznaczonymi mutacjami w badanych genach PARK, a postępem choroby w skali Hoehn-Yahra i występowanie objawów neuropsychiatrycznych (stopień otępienia w skali MMSE, klinicznie rozpoznane objawy depresji), a także z odpowiedzią na stosowaną farmakoterapię L-dopą.

## 3. Materiały i metody

### 3.1. MATERIAŁY

#### 3.1.1. GRUPA BADANA

Do grupy badanej wyselekcjonowano 90 chorych z klinicznie rozpoznaną chP w oparciu o kryteria UKPDSBB [178], jako SchP spośród zbadanych 200 osób z zaburzeniami układu pozapiramidowego. Dane demograficzne chorych z chP zestawiono w tabeli 6. W grupie chorych z chP, w momencie włączenia do badań, dwie osoby były w wieku poniżej 40 r.ż. i podobnie jak u pozostałych badanych, w ich wywiadzie rodzinnym nie stwierdzono przypadków RchP oraz nie potwierdzono w niniejszych badaniach obecności mutacji c.88 G>C genu *SNCA* warunkującej jedną z postaci RchP [69].

Szczegółowe kryteria włączenia i wyłączenia do badań w grupie chorych z chP zamieszczono w tabeli 7.

Tab. 6. Dane demograficzne w analizowanych grupach osób

Dane demograficzne	Grupa chorych z chP	Grupa chorych z MSA	Grupa chorych z zespołem parkinsonowskim w przebiegu choroby zwyrodnieniowej	Grupa kontrolnych ochotników
<b>badane osoby (N)</b>	90	3	35	113
<b>kobiety/ mężczyźni (N)</b>	43/47	3/0	16/19	79/34
<b>wiek (w latach)</b>	34-82	53-63	38-86	39-83
<b>średnia wieku±SD (w latach)</b>	62,0±10,2	57,2±4,0	57,8±10,3	55,5±9,5

N- liczba badanych osób.

Wśród osób z chP największą grupę stanowili chorzy, u których choroba trwała nie dłużej niż 5 lat (41%), a najmniejszą z czasem trwania choroby powyżej 10 lat (24%), natomiast w przedziale 5-10 lat odsetek chorych wynosił 35%.

Stopień zaawansowania chP oceniano u chorych w 5 stopniowej skali Hoehn-Yahra [26]. Największą liczbę chorych z chP stanowiły osoby z 2 stopniem

zaawansowania choroby (53%), następnie z 1 (20%), 3 (19%), 4 (5%), a najmniejszą z 5 (2%) stopniem rozwoju tego schorzenia.

Stopień otępienia u chorych z chP oceniano za pomocą skali MMSE [179]. U chorych z chP zespół otępienia stopnia łagodnego (26-24 punkty w skali MMSE) stwierdzono u 6%, natomiast łagodne zaburzenia funkcji poznawczych (*ang. Mild Cognitive Impairment*, MCI; 23-19 punktów w skali MMSE) występowały u 9% badanych.

Tab. 7. Kryteria włączenia i wyłączenia do badań w poszczególnych analizowanych grupach

Grupa osób	Kryteria włączenia do grupy	Kryteria wyłączenia z grupy
<b>Chorzy z chP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Zgoda na udział w badaniach</li> <li>b) Kliniczne rozpoznanie chP przez specjalistę neurologa zgodnie z obowiązującymi kryteriami klinicznego rozpoznania choroby</li> <li>c) Nieobecność chP w rodzinie</li> <li>d) Odpowiednia ilość i jakość materiału do badań</li> <li>e) Dostępność danych, takich jak: wiek, płeć, czas trwania choroby, historia farmakoterapii i odpowiedź na leczenie, stopień zaawansowania choroby.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Brak zgody na udział w badaniach</li> <li>b) Urazy mózgu lub infekcja OUN i inne choroby neurologiczne</li> <li>c) Parkinsonizm wtórny</li> <li>d) Atypowy parkinsonizm.</li> </ul>
<b>Chorzy z MSA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Zgoda na udział w badaniach,</li> <li>b) Postawienie diagnozy MSA przez lekarza specjalistę neurologa, zgodnie z obowiązującymi kryteriami klinicznego rozpoznania choroby,</li> <li>c) Znany wiek i płeć,</li> <li>d) Nieobecność innych chorób neurologicznych.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Brak zgody na udział w badaniach,</li> <li>b) Obecność innych chorób neurologicznych.</li> </ul>
<b>Chorzy z zespołem parkinsonowskim</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Zgoda na udział w badaniach,</li> <li>b) Rozpoznanie objawów zespołu parkinsonowskiego w przebiegu choroby zwyrodnieniowej przez lekarza specjalistę neurologa, zgodnie z obowiązującymi kryteriami</li> <li>c) Znany wiek i płeć,</li> <li>d) Nieobecność innych chorób neurologicznych.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Brak zgody na udział w badaniach,</li> <li>b) Obecność innych chorób neurologicznych.</li> </ul>
<b>Kontrolni Ochothnicy</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Zgoda na udział w badaniach</li> <li>b) Niestwierdzone choroby neurologiczne i cechy otępienia</li> <li>c) Znany wiek i płeć</li> <li>d) Nieobecność chP w rodzinie.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a) Brak zgody na udział w badaniach</li> <li>b) Obecność chP w rodzinie</li> <li>c) Obecność chorób neurologicznych lub cech otępienia.</li> </ul>



Chorzy z chP, MSA oraz z rozpoznaniem zespołem parkinsonowskim w przebiegu choroby zwyrodnieniowej byli hospitalizowani w Klinice Neurologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2010–2013. Chorzy zostali zaklasyfikowani do poszczególnych grup na podstawie klinicznego rozpoznania przez specjalistę neurologa. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (No. 525/10 z dnia 17.06.2010).

### 3.1.2. GRUPY CHORYCH Z INNYMI ZABURZENIAMI UKŁADU POZAPIRAMIDOWEGO

Badaniu poddano również 3 chorych z rozpoznaniem MSA, oraz 35 chorych z rozpoznaniem zespołem parkinsonowskim w przebiegu choroby zwyrodnieniowej (w oparciu o kryteria ich klinicznego rozpoznania). Dane demograficzne analizowanych grup zestawiono w tabeli 6.

Szczegółowe kryteria włączenia i wyłączenia w grupie chorych z MSA oraz z rozpoznaniem zespołem parkinsonowskim w przebiegu choroby zwyrodnieniowej, zamieszczono w tabeli 7.

### 3.1.3. GRUPA KONTROLNYCH OCHOTNIKÓW

Grupa kontrolnych ochotników obejmowała 113 osób, dobranych pod względem wieku bez stwierdzonych chorób neurologicznych oraz cech otępienia. Dane demograficzne tej grupy przedstawiono w tabeli 6.

Szczegółowe kryteria włączenia i wyłączenia w grupie kontrolnych ochotników zamieszczono w tabeli 7.

Wszystkie badane osoby lub ich opiekunowie wyrazili pisemną zgodę na badania genetyczne i przetwarzanie danych.

### 3.1.4. MATERIAŁ DO BADAŃ GENETYCZNYCH

Materiał do badań genetycznych stanowiła pełna krew żylna (2 - 5 ml) pobrana na wersenian potasu od osób z analizowanych grup. Pobraną krew zamrażano w temperaturze -80°C i przechowywano w tych warunkach do czasu izolacji DNA.

### 3.1.5. APARATURA

W celu pobrania i izolacji materiału do badań genetycznych oraz przeprowadzenia wybranych analiz na obecność mutacji i polimorfizmów genów wykorzystano aparaturę i sprzęt zestawiony w tabeli 8.

Tab. 8. Aparatura laboratoryjna i sprzęt używany do izolacji DNA i przeprowadzenia badań genetycznych

Aparat/sprzęt	Producent
Termocykler Light Cycler 480	Roche (Szwajcaria)
Termocykler MJ Mini	Bio-Rad (USA)
Sekwencjonator 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems HITACHI (USA)
Aparat do elektroforezy poziomej	Bio-Rad (USA)
System dokumentacji żeli Photo Doc	UVP (Kanada)
Wirówka Mini Spin	Eppendorf (Niemcy)
Bio Vortex V1	BIOSAN (Polska)
Waga analityczna	Kern (Niemcy)
Pipety automatyczne	Eppendorf (Niemcy)
Sprzęt jednorazowego użytku	Eppendorf (Niemcy)
Statyw magnetyczny	Novazym (Polska)

### 3.1.6. ODCZYNNIKI CHEMICZNE

Badania genetyczne wykonano z zastosowaniem odczynników do badań molekularnych o najwyższej, jakości i czystości analitycznej oraz chemicznej, renomowanych firm krajowych i zagranicznych (Tab. 9).

Tab. 9. Odczynniki używane w badaniach molekularnych zastosowane do izolacji DNA i analiz genetycznych

Odczynnik	Producent
Kit do izolacji – Novabeads Blood Genomic DNA Kit	Novazym (Polska)
Kit do reakcji HRM Real-Time PCR - LightCycler® 480 High Resolution Melting Master	Roche Diagnostics (USA)
Agaroz	Sigma (Niemcy)
Bufor TBE 10x	Bio-Rad (USA)
Barwnik do żeli agarozowych Gel View/ Midori Green DNA Stain	Novazym(Polska)/ NIPPON Genetics (Japonia)
Polimeraza – Proof High-Fidelity Master Mix	Bio-Rad (USA)
dNTPs MIX, Bufor dla polimerazy 10x Polimeraza - Allegro Taq, Roztwór MgCl <sub>2</sub> 25 µM	Novazym (Polska)
Marker wielkości DNA – GeneRuler 100bp DNA Ladder	Fermentas (Litwa)
Oligonukleotydy	Oligo, Pracownia Sekwencjonowania DNA IBB PAN (Polska)
Enzymy restrykcyjne MvaI, MboII, MspI, TaaI, BsuRI, SsiI	Fermentas (Litwa)
Bufor obciążający – Orange DNA Loading Dye	Fermentas (Litwa)
Alkohol etylowy 70%	Merck (Niemcy)

3.1.7. OPROGRAMOWANIE I BAZY DANYCH UŻYWANE  
DO PROJEKTOWANIA ANALIZ GENETYCZNYCH  
ORAZ OBRÓBKI UZYSKANYCH DANYCH

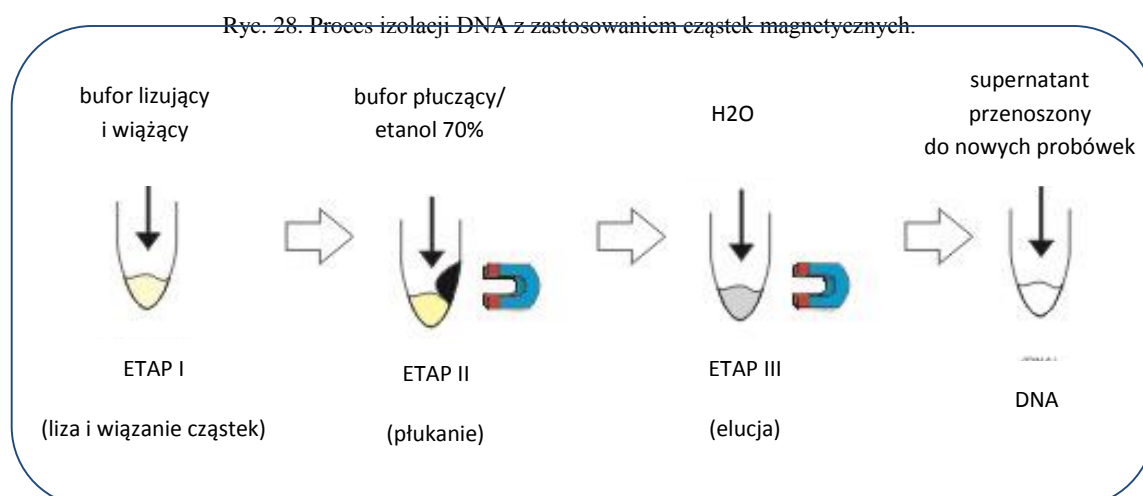
- ✓ BioEdit,
- ✓ Peak Scanner Software v.1.0 – Applied Biosystems,
- ✓ National Center for Biotechnology Information (PubMed, OMIM, SNP, Blast) –  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>,
- ✓ UCSC Genome Bioinformatics (genome Browser, Blast) – <http://genome.ucsc.edu>,
- ✓ Ensembl Genome Browser – <http://www.ensembl.org>,
- ✓ internetowa baza danych enzymów restrykcyjnych -  
<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>,
- ✓ GeneCards Homepage - <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/cards>,
- ✓ Webcutter 2.0, program analizujący miejsca restrykcyjne - <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>.

## 3.2. METODY

### 3.2.1. IZOLACJA DNA GENOMOWEGO Z KOMÓREK KRWI OBWODOWEJ

DNA izolowano z komórek jądrzastych krwi obwodowej z zastosowaniem kitu zawierającego cząstki magnetyczne (Tab. 9).

Metoda opierała się na zastosowaniu syntetycznego kompozytowego złoża magnetycznego selektywnie wiążącego kwasy nukleinowe. W celu wyizolowania DNA genomowego przeprowadzano lizę komórek, dodając do próbki krwi, buforu do lizy w stosunku 1:2. Po 15 min. inkubacji w temperaturze pokojowej do mieszaniny dodawano bufor wiążący w stosunku 2:1 i zawiesiny cząstek magnetycznych w stosunku 9:1. Mieszaninę wytrząsano i inkubowano przez 15 min. w temperaturze pokojowej. Następnie umieszczano w statywie magnetycznym i usuwano supernatant. Osad z cząstkami magnetycznymi przemywano trzykrotnie odpowiednimi buforami płuczącymi w celu wymycia zanieczyszczeń. W kolejnym etapie cząstki magnetyczne przemywano równoważną ilością 80% etanolu i osuszano. W ostatnim etapie, w celu uwolnienia DNA ze złoża, do cząstek magnetycznych dodawano równoważną ilość jałowej wody dejonizowanej. Próbkę inkubowano przez 15 min. w temperaturze 65°C i wytrząsano. Następnie próbkę umieszczano w statywie magnetycznym i zbierano supernatant zawierający DNA (Ryc. 28). Do dalszych analiz próbki przechowywano w temperaturze -20°C.



Ocenę jakościową i ilościową wyizolowanego DNA wykonano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym oraz metodą spektrofotometryczną przy długości fali 260 nm (maksimum

absorbancji DNA) oraz 280 nm (maksimum absorbancji białka). Do dalszych badań używano próbki, dla których stosunek OD260/OD280 wynosił więcej niż 1,7.

### 3.2.2. KRYTERIA WYBORU GENÓW PARK (UZNANYCH I KANDYDACKICH)

#### DO BADAŃ GENETYCZNYCH

Do badań genetycznych wybrano 5 genów PARK: *SNCA*, *PRKN*, *LRRK2*, *HTRA2*, *SPR* [Tab. 10] o prawdopodobnym związku ze SchP i pewnym związku z występowaniem RchP, a także gen *SPR* kandydujący do lokus PARK3 o nie całkowicie potwierdzonym związku z chP. Mutacje i polimorfizmy w obrębie genów *SNCA*, *PRKN*, *LRRK2*, *HTRA2*, *SPR* wybrano kierując się następującymi kryteriami:

- ✓ częstością występowania zmian genetycznych w różnych populacjach wynikającą z doniesień literaturowych,
- ✓ dostępnością metod analitycznych umożliwiającą badanie danej mutacji/polimorfizmu,
- ✓ położeniem mutacji/polimorfizmu w obrębie eksonów lub regionów regulatorowych genu,
- ✓ funkcjonalnością mutacji/polimorfizmu,
- ✓ brakiem badań lub wstępными doniesieniami w populacji polskiej (po jednej pracy dotyczącej genu *PRKN* i *LRRK2*;) [140,175].

Ponadto, ze względu na mnogość możliwych mutacji punktowych w genach *PRKN* i *LRRK2* poddano je analizie przesiewowej. Natomiast analizę występowania mutacji c.88 G>C genu *SNCA* przeprowadzono w celu wykluczenia występowania RchP warunkowanej tą mutacją.

Tab. 10. Wykaz analizowanych genów i mutacji/polimorfizmów

Gen	Kodowane białko	Polimorfizm/Mutacja	Lokalizacja	Allele
<b>SNCA</b> <b>PARK1</b> <b>PARK4</b>	Alfa-synukleina	NACP-Rep1 **	Promotor	-1, 0, +1, +2, +3
		c.88 G>C	Ekson 3	G/C
<b>PRKN</b> <b>PARK2</b>	Parkina	Delecja eksonu	Ekson 2	D/O*
		c.110 C>T	Ekson 2	C/T
		c.111G>A	Ekson 2	G/A
		Delecja eksonu***	Ekson 4	D/O*
		Analiza przesiewowa eksonu	Ekson 4	-
		Analiza przesiewowa eksonu	Ekson 7	-
		c. 930G>C*****	Ekson 8	G/C
<b>LRRK2</b> <b>PARK8</b>	Kinaza bogata w powtórzenia leucyny typu 2	Analiza przesiewowa eksonu	Ekson 41	-
<b>SPR</b> <b>PARK3?</b>	Reduktaza sepiapteryny	c.637 T>A*****	Ekson 3	T/A
		c.637 T>G*****	Ekson 3	T/G
<b>HTRA2</b> <b>PARK13</b>	Proteaza serynowa HTRA2	c.421 G>T	Ekson 1	G/T
		c.1195 G>A	Ekson 7	G/A
		c.1210 C>T	Ekson 7	C/T

\*D - delecja eksonu, O - brak delecji w eksonie,

\*\* nie wykonano analizy dla próbki 174 (rozpoznany zespół parkinsonowski) ze względu na małą ilość materiału genetycznego,

\*\*\* nie wykonano analizy dla próbek: 146, 150 (kontrola), 178, 205-209, 211-215 (rozpoznana chP), 218 (rozpoznany zespół parkinsonowski) ze względu na małą ilość materiału genetycznego,

\*\*\*\* nie wykonano analizy dla próbek 150 (kontrola), 40, 158, 178, 205-209, 211-215 (rozpoznana chP), 174, 217, 218, 254 (rozpoznany zespół parkinsonowski) ze względu na małą ilość materiału genetycznego,

\*\*\*\*\* nie wykonano analizy dla próbki 26 (rozpoznana chP) ze względu na małą ilość materiału genetycznego.

Analizę mutacji/polimorfizmów wybranych genów PARK przedstawionych w tabeli 10 wykonano z wykorzystaniem następujących metod molekularnych: PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*), RT-PCR/HRM (ang. *Real Time-PCR/High Resolution Melting*), sekwencjonowania oraz analizy restrykcyjnej, w których zastosowano odpowiednio dobrane startery (Tab. 11 i Tab. 12).

### 3.2.3. WYZNACZANIE STARTERÓW DO ANALIZY GENÓW PARK

Startery do amplifikacji eksonu 2 genu *PRKN* oraz regionu promotorowego genu *SNCA* wybrano na podstawie doniesień literaturowych [85,180,181]. Pozostałe zastosowane startery zaprojektowano za pomocą programu Primer3+, na podstawie sekwencji genów dostępnych w internetowych bazach danych (Ensemble, Genome Browser). Specyficzność starterów sprawdzono porównując ich sekwencje z sekwencją genomu ludzkiego z

zastosowaniem analizy BLAST (*ang. Basic Local Alignment Search Tool*). Wielkość amplikonów dobierano w zależności od zastosowanej metody (krótsze produkty dla analizy HRM – ok. 100 pz, oraz dłuższe do analizy RFLP – ok. 400 pz). Sekwencje starterów, wykorzystane sekwencje referencyjne oraz wielkość produktów PCR, przedstawiono w tabeli 11.

Tab. 11. Sekwencje starterów stosowanych do analizy mutacji i polimorfizmów wybranych genów PARK

gen/ ekson	nazwa startera	sekwencja startera	sekwencja referencyjna	źródło	metoda analizy	wielkość produktu
<b>SNCA promo-tor</b>	B22	GACTGGCCCAAGATTAACCA	-	[85]	Elektroforeza kapilarna	255-263 pz
	B35	CCTGGCATATTTGATTGCAA				
<b>SNCA/3</b>	B25	AAGTGTATTTTATGTTTTCC	NG_011851.1 NM_001146055.1	[180]	RFLP	192 pz
	B26	AACTGACATTTGGGGTTTACC				
<b>PRKN/2</b>	B19	ATGTTGCTATCACCATTTAAG	NG_008289.1 NM_004562.2	[181]	PCR	308 pz
	B20	AGATTGGCAGCGCAGGCGGCA				
<b>PRKN/2*</b>	B23	TTCCCAAATATTGCTCTA	NG_008289.1 NM_004562.2	PRIMER 3+	PCR/ RFLP	475 pz
	B24	GCAGTGTGGAGTAAAGTTCAAGG				
<b>PRKN/4</b>	B9	GCATTATTAGCCACTTCTTCTGC	NG_008289.1 NM_004562.2	PRIMER 3+	HRM/ PCR	181 pz
	B10	TGCTGACACTGCATTTTCCTT				
<b>PRKN/4*</b>	B12b	AGATTTCACTCTTGGAGCATAAA	NG_008289.1 NM_004562.2	PRIMER 3+	PCR	488 pz
	B14	CAAAGGCGCATAAACGAAA				
<b>PRKN/7</b>	B1	TCCTGGTTTTCCAGTGCAAC	NG_008289.1 NM_004562.2	PRIMER 3+	HRM	123 pz
	B2	AAGGCAGGGAGTAGCCAAGT				
<b>PRKN/8</b>	B27	CTAAAGAGGTGCGGTTGGAG	NG_008289.1 NM_004562.2	PRIMER 3+	RFLP	344 pz
	B28	GGAGCCCAAAGTGTCTCATT				
<b>PRKN/11</b>	B6	CCGACGTACAGGGAACATAAA	NG_008289.1 NM_004562.2	PRIMER 3+	HRM	167 pz
	B7	GGACAGGGCTTGGTGGTT				
<b>LRRK2/41</b>	B15	ATACCTCCACTCAGCCATGA	NG_011709.1 NM_198578.2	PRIMER 3+	HRM	200 pz
	B16	TCCTGAAGATAGAATTATGAGAC AGA				
<b>SPR/3</b>	B33	TCCATGTTTCAGTGGGCTTTT	NG_008234.1 NM_003124.4	PRIMER 3+	RFLP	335 pz
	B34	TTTCTGGGCTGACACCTTG				
<b>HTRA2/1</b>	B29	TATGGGACCCCCAGTCTC	NG_012163.1 NM_013247.4	PRIMER 3+	RFLP	454 pz
	B30	AAATGGAGGAAAGCACAGA				
<b>HTRA2/7</b>	B31	GTCATTTGGTGCCCTCATGT	NG_012163.1 NM_013247.4	PRIMER 3+	RFLP	466 pz
	B32	TGTACCATCTGCTCCCAAT				

\* startery zewnętrzne.

## 3.2.4. BADANIE WYSTĘPOWANIA DELECJI EKSONÓW 2 I 4

GENU *PRKN* METODĄ PCR

W celu analizy występowania delecji eksonów 2 i 4 genu *PRKN* przeprowadzono reakcję PCR w objętości 25  $\mu$ l mieszaniny z użyciem ok. 10 ng genomowego DNA, w dobranych doświadczalnie warunkach temperaturowych (Tab. 12). W przypadku eksonu 2 genu *PRKN* empirycznie ustalono również optymalne stężenie jonów  $Mg^{2+}$ .

Tab. 12. Wyznaczone temperatury przyłączania starterów oraz wielkości poszczególnych ampikonów

Gen/ekson	Starter F	StarterR	Temperatura przyłączenia starterów	Wielkość produktu
<b>SNCA/promotor</b>	B22	B35	67°C	255-263 pz
<i>SNCA/3</i>	B25	B26	53°C	192 pz
<i>PRKN/2</i>	B19	B20	50°C	308 pz
<i>PRKN/2*</i>	B23	B24	53°C	475 pz
<i>PRKN/4</i>	B9	B10	63°C	181 pz
<i>PRKN/4*</i>	B12b	B14	60°C	488 pz
<i>PRKN/7</i>	B1	B2	64°C	123 pz
<i>PRKN/8</i>	B27	B28	60°C	344 pz
<i>PRKN/11</i>	B6	B7	64°C	167 pz
<i>LRRK2/41</i>	B15	B16	63°C	200 pz
<i>SPR/3</i>	B33	B34	59°C	335 pz
<i>HTRA2/1</i>	B29	B30	50°C	454 pz
<i>HTRA2/7</i>	B31	B32	60°C	466 pz

\* startery zewnętrzne.

Skład mieszaniny reakcyjnej do analizy delecji eksonów 2 i 4 genu *PRKN* podano w tabeli 13.

Tab. 13. Skład mieszanin reakcyjnych dla metody PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Objętość [ $\mu$ l]											
		Ex.3 SNCA	Ex.2 PRKN	Ex.2* PRKN	Ex.4 PRKN	Ex.4* PRKN	Ex.7 PRKN	Ex.8 PRKN	Ex.11 PRKN	Ex. 41 LRRK2	Ex.1 HTRA2	Ex.7 HTRA2	Ex.3 SPR
<b>Woda</b>	-	16,9	16,6	17,6	17,5	17,1	18,15	17,8	17,4	18,75	18	17,8	17,3
<b>Bufor do PCR 10x</b>	10x	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>dNTPs mix</b>	10 mM	0,8	0,7	1	0,7	1	0,5	0,8	0,7	0,5	0,6	0,8	0,8
<b>Starter F</b>	25 pmol/ $\mu$ l	1,2	0,7	1	1	1	0,8	0,8	1	0,5	0,8	0,8	1
<b>Starter R</b>	25 pmol/ $\mu$ l	1,2	0,7	1	1	1	0,8	0,8	1	0,5	0,8	0,8	1
<b>Polimeraza</b>	5 U/ $\mu$ l	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,25	0,3	0,4	0,25	0,3	0,3	0,4
<b>DNA</b>	~5 $\mu$ g/ $\mu$ l	2	2	1,5	2	2	2	2	2	2	2	2	2



W celu potwierdzenia obecności delecji eksonów 2 i 4 genu *PRKN* uzyskane produkty reakcji PCR poddawano elektroforezie w 2% żelu agarozowym według standardowej procedury.

### 3.2.5. BADANIE MUTACJI PUNKTOWYCH W EKSONACH 4, 7, 11 GENU *PRKN* ORAZ EKSONU 41 GENU *LRRK2* Z ZASTOWANIEM METOD HRM, PCR I SEKWENCJONOWANIA

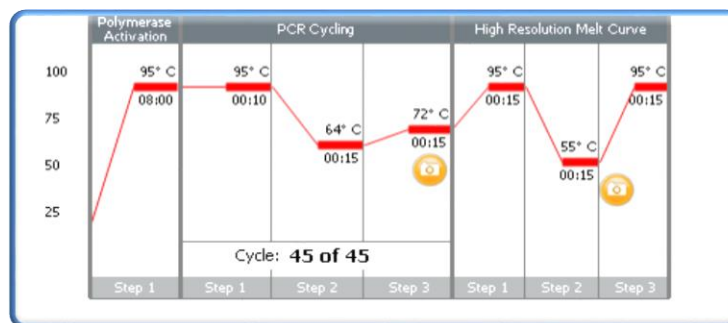
#### *3.2.5.1. PRZESIEWOWA ANALIZA HRM EKSONÓW 4, 7, 11 GENU *PRKN* ORAZ EKSONU 41 GENU *LRRK2**

Analizę mutacji punktowych w eksonach 4, 7, 11 genu *PRKN* oraz eksonu 41 genu *LRRK2* wykonano metodą HRM z zastosowaniem zestawu LightCycler 480 High Resolution Melting Master firmy Roche używając 10 µl mieszaniny reakcyjnej. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli 14.

Tab. 14. Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji RT-PCR/HRM przeprowadzanej dla genów *PRKN* i *LRRK2*

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Objętość [µl]			
		Ex.4 <i>PRKN</i>	Ex.7 <i>PRKN</i>	Ex.11 <i>PRKN</i>	Ex.41 <i>LRRK2</i>
<b>Woda</b>	-	22	22	22	1,8
<b>Master mix</b>	2 x	5	5	5	5
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1	1	1	1,4
<b>Starter F</b>	25 pmol/µl	0,4	0,4	0,4	0,4
<b>Starter R</b>	25 pmol/µl	0,4	0,4	0,4	0,4
<b>DNA</b>	5 µg/µl	1	1	1	1

Optymalizację warunków reakcji HRM dla każdego z badanych fragmentów genów *PRKN* i *LRRK2* wykonano dobierając odpowiednie stężenie jonów Mg<sup>2+</sup> oraz warunki temperaturowe. Reakcję prowadzono w aparacie LightCycler 480 oraz potwierdzano w aparacie Eco Real Time zgodnie z profilem temperaturowo-czasowym zamieszczonym na rycinie 29.



Ryc. 29. Przykładowy profil temperaturowo-czasowy dla przeprowadzanej reakcji RT-PCR/HRM.

W metodzie HRM przyjęto, że krzywe topnienia dla próbek bez mutacji odpowiadały tej samej temperaturze topnienia i miały podobny przebieg na wykresie. Jednocześnie próbki z prawdopodobną mutacją posiadały odmienną temperaturę topnienia oraz inny przebieg krzywej na wykresie.

Próbki z prawdopodobną mutacją w genach *PRKN* oraz *LRRK2* wyznaczone w metodzie HRM poddawano sekwencjonowaniu. Dla potwierdzenia czułości metody HRM sekwencjonowano również losowo wybrane produkty PCR genów *PRKN* oraz *LRRK2* o prawidłowym przebiegu krzywej topnienia.

### 3.2.5.2. SEKWENCJONOWANIE EKSONÓW 4, 7, 11 *GENU PRKN ORAZ EKSONU 41 GENU LRRK2*

W celu identyfikacji mutacji w genach *PRKN* oraz *LRRK2* badany fragment genu amplifikowano metodą PCR (Tab. 8), a następnie oczyszczano z genomowego DNA oraz starterów i sekwencjonowano. Analizę sekwencjonowania przeprowadzono na sekwenatorze 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems HITACHI, USA) w niezależnej Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej przy Wydziale Biologii UAM w Poznaniu.

Wyniki sekwencjonowania analizowano za pomocą programu BioEdit na podstawie sekwencji referencyjnych dostępnych w internetowych bazach danych (Ensemble, Genome Browser).

### 3.2.6. ANALIZA MUTACJI PUNKTOWYCH GENÓW *SNCA*, *PRKN*,

#### *HTRA2* I *SPR* METODĄ PCR

##### I POLIMORFIZMU DŁUGOŚCI FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH RFLP

W celu oznaczenia mutacji w eksonach: 3 genu *SNCA*, 2 i 8 genu *PRKN*, 1 i 7 genu *HTRA2* oraz 3 genu *SPR* przeprowadzono amplifikację materiału genetycznego metodą PCR. Warunki amplifikacji oraz skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli 13. Dla zbadania obecności mutacji w analizowanych genach produkt PCR poddano analizie RFLP (skład mieszaniny podano w tabeli 15) z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych dobranych za pomocą programu NEBcutter v2.0 w oparciu o sekwencje referencyjne. W kolejnym etapie produkty reakcji RFLP rozdzielano na 3% żelu agarozowym. Wielkości produktów trawienia enzymatycznego odpowiadające próbkom z analizowaną mutacją i bez mutacji przedstawiono w tabeli 16.

Tab. 15. Skład mieszaniny reakcyjnej dla metody RFLP

<b>Składnik mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>Objętość [μl]</b>
<b>Woda</b>	7
<b>Produkt PCR</b>	10
<b>Bufor</b>	2
<b>Enzym restrykcyjny</b>	1

Tab. 16. Enzymy restrykcyjne zastosowane do analizy mutacji genów *SNCA*, *PRKN*, *HTRA2* i *SPR* metodą RFLP

Gen	polimorfizm	Enzym restrykcyjny	Rozpoznawana sekwencja	Temperatura inkubacji	Długość produktu RFLP
<i>SNCA</i> / 3	c.88 G>C	<b>MvaI</b>	CC/WGG	37°C	<b>Prawidłowy:</b> 192 pz
					<b>Zmutowany:</b> 136+56 pz
<i>PRKN</i> / 2*	c.110 C>T	<b>HaeIII</b>	GG/CC	37°C	<b>Prawidłowy:</b> 273+202 pz
	c.111G>A				<b>Zmutowany:</b> 475 pz
<i>PRKN</i> / 8	c. 930G>C	<b>MvaI</b>	CC/WGG	37°C	<b>Prawidłowy:</b> 23+321 pz
					<b>Zmutowany:</b> 23+248+73 pz
<i>SPR</i> /3	c.637 T>A	<b>TaaI</b>	ACN/GT	65°C	<b>Prawidłowy:</b> 335 pz
					<b>Zmutowany:</b> 254+81 pz
<i>SPR</i> /3	c.637 T>G	<b>SsiI</b>	C/CGC	37°C	<b>Prawidłowy:</b> 335 pz
					<b>Zmutowany:</b> 250+85 pz
<i>HTRA</i> 2/1	c.421 G>T	<b>MboII</b>	GAAGA(N) <sub>8</sub> /	37°C	<b>Prawidłowy:</b> 324+130 pz
					<b>Zmutowany:</b> 259+65+130 pz
<i>HTRA</i> 2/7	c.1195 G>A	<b>MvaI</b>	CC/WGG	37°C	<b>Prawidłowy:</b> 175+113+139+39 pz
					<b>Zmutowany:</b> 175+252+39 pz
<i>HTRA</i> 2/7	c.1210 C>T	<b>MspI</b>	C/CGG	37°C	<b>Prawidłowy:</b> 305+161 pz
					<b>Zmutowany:</b> 466 pz

### 3.2.7 ANALIZA POLIMORFIZMU REGIONU NACP-REP1

#### METODĄ PCR I ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ

W celu zbadania polimorfizmu regionu NACP-Rep1 w obrębie promotora genu *SNCA* próbki DNA amplifikowano metodą PCR z zastosowaniem pary specyficznych starterów, z których jeden wyznakowano barwnikiem fluorescencyjnym FAM (ang. *6-carboxyfluorescein*). Skład mieszaniny reakcyjnej dla metody PCR podano w tabeli 17.

Tab. 17. Skład mieszaniny reakcyjnej dla metody PCR

Składnik mieszaniny reakcyjnej	Stężenie wyjściowe	Objętość [ $\mu$ l]
Woda	-	9,3
iProof Master Mix	2 x	12,5
Starter F	25 pmol/ $\mu$ l	0,6
Starter R	25 pmol/ $\mu$ l	0,6
DNA	$\sim$ 5 $\mu$ g / $\mu$ l	2

Dla oceny ilości powtórzeń dwunukleotydowych regionu NACP-Rep1, produkt PCR poddawano elektroforezie kapilarnej z zastosowaniem wzorca wielkości. Rozdział elektroforetyczny prowadzono za pomocą analizatora 3130xl Genetic Analyser w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej przy Wydziale Biologii UAM w Poznaniu. Oceny rozdzielności elektroforetycznych produktów PCR prowadzono z zastosowaniem programu Peak Scanner Software v1.0.

### 3.2.8 KONTROLA JAKOŚCI PRZEPROWADZONYCH BADAŃ

W celu kontroli jakości przeprowadzonych badań genetycznych wykonano następujące czynności:

- ✓ dla reakcji PCR każdorazowo zastosowano kontrolę pozytywną oraz negatywną,
- ✓ dla reakcji RFLP zastosowano kontrole pozytywne dla enzymów rozpoznających miejsce mutacji,
- ✓ dla metody elektroforezy na żelu agarozowym każdorazowo stosowano wzorzec wielkości DNA,
- ✓ w przypadku uzyskania wyników *niepewnych*, szczególnie podczas analizy RFLP, oraz HRM próby poddawano sekwencjonowaniu,

- ✓ w celu potwierdzenia prawidłowo wykonanych analiz genetycznych, każdorazowo losowo wybierano 10% prób do powtórnego oznaczenia,
- ✓ w przypadku wykrycia mutacji analizę powtarzano od pierwszego etapu badań,
- ✓ próby badane oraz kontrolne zostały ponumerowane i zakodowane tak, aby podczas badań uniemożliwić odróżnienie prób kontrolnych od badanych i zapewnić obiektywizację uzyskanych wyników. Próby rozkodowywano po zakończeniu badań.

### 3.2.9 ANALIZA STATYSTYCZNA

W celu oceny statystycznej uzyskanych wyników badań na obecność mutacji i polimorfizmów w genach: *SNCA*, *PRKN*, *HTRA2* oraz *SPR* zastosowano testy nieparametryczne dla zmiennych niepowiązanych: test Chi<sup>2</sup>, dokładny test Fishera, test dla dwóch wskaźników struktury.

W celu oceny wpływu wykazanych mutacji i polimorfizmów na ryzyko ujawnienia się choroby obliczano iloraz szans (ang. *Ods Ratio*, OR) i przyjęto 95% przedział ufności.

Stan równowagi Hardy-Weinberga w badanych grupach oceniano z zastosowaniem programu [www.ihg.gfs.de](http://www.ihg.gfs.de) (Institute of Human Genetics, Technical University Munich and Helmholtz Center Munich).

W celu oceny wpływu wykrytej mutacji na postęp choroby, występowanie cech otępienia, objawów depresji oraz odpowiedź na farmakoterapię L-dopą zastosowano korelacje Spearmana.

Dla zastosowanych testów statystycznych przyjęto poziom istotności  $\alpha = 0,05$ . Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą oprogramowania Statistica for Windows (StatSoft, USA), w Zakładzie Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Uniwersytetu Medycznego imienia Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

## 4. Wyniki

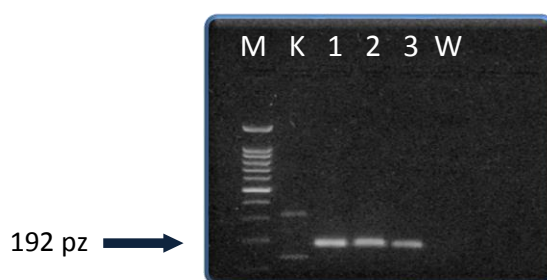
Badaniu poddano częstość występowania mutacji/polimorfizmów w genach PARK: *SNCA*, *PRKN*, *LRRK2*, *HTRA2*, *SPR* związanych z RchP i/lub SchP. Wybrane mutacje w genach PARK badano zarówno u chorych z zaburzeniami układu pozapiramidowego: chP i zespół parkinsonowski oraz MSA, jak i u kontrolnych ochotników.

### 4.1. ANALIZA MUTACJI W REGIONIE KODUJĄCYM ORAZ ODCINKU PROMOTOROWYM GENU *SNCA*

U chorych z chP mutacje w genie *SNCA* oznacza się zarówno w części kodującej (c.88 G>C), jak i promotorowej tego genu (NACP-Rep1).

#### 4.1.1. ANALIZA WYSTĘPOWANIA MUTACJI C.88 G>C GENU *SNCA*

W przeprowadzonych badaniach nie wykazano obecności mutacji c.88 G>C w eksonie 3 genu *SNCA* u żadnej z badanych osób, zarówno u chorych, jak i kontrolnych ochotników. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktu reakcji PCR/RFLP przedstawiono na rycinie 30, pojedynczy prążek oznacza brak analizowanej mutacji.



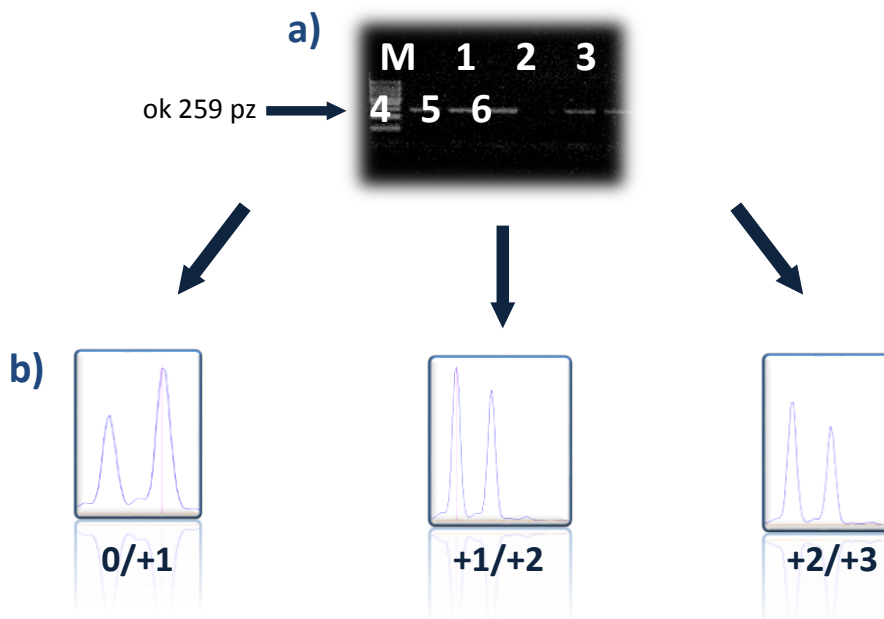
Ryc. 30. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR-RFLP eksonu 3 genu *SNCA* z zastosowaniem enzymu *Mva*I.

M-marker wielkości DNA, K- kontrola pozytywna działania enzymu,

1-3 – produkty reakcji, W- kontrola negatywna reakcji PCR.

4.1.2. ANALIZA POLIMORFIZMU ILOŚCI POWTÓRZEŃ  
DWUNUKLEOTYDOWYCH W OBRĘBIE REGIONU NACP-REP1  
PROMOTORA GENU *SNCA*

Na rycinie 31 przedstawiono przykładowe rozdziały elektroforetyczne produktów PCR regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA*.



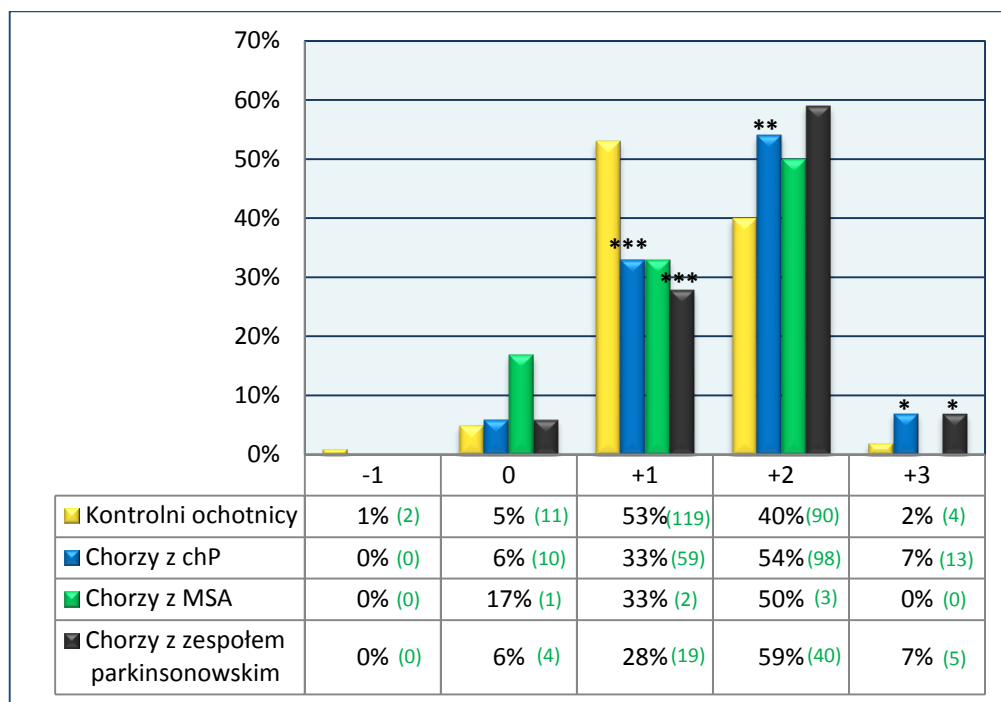
Ryc. 31. Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego w żelu (a) i elektroforezy kapilarnej (b) produktów reakcji PCR promotora genu *SNCA*.

M-marker wielkości DNA, 1-3, 5, 6 – produkty reakcji PCR,

W- kontrola negatywna reakcji PCR.

Przyjęto następujące oznaczenia najczęściej występujących alleli: -1 (255 pz), 0 (257 pz), +1 (259 pz), +2 (261 pz), +3 (263 pz). Częstość występowania poszczególnych wykazanych alleli regionu promotorowego genu *SNCA* u osób badanych i kontrolnych przedstawiono graficznie (Ryc. 32).





Ryc. 32. Częstość występowania poszczególnych alleli regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA* u osób badanych i kontrolnych.

W nawiasach podano liczebność oznaczonych alleli. Zastosowano test dla dwóch składników struktury, statystycznie istotne różnice przy poziomie: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  w porównaniu z kontrolą.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że częstość występowania allelu +1 regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA* była największa u kontrolnych ochotników i u tych osób była jednocześnie istotnie wyższa w porównaniu do chorych z chP oraz z zespołem parkinsonowskim w przebiegu choroby zwyrodnieniowej (test dla dwóch składników struktury,  $p < 0,001$ ). Ponadto częstość występowania tego allelu w grupie chorych z chP w porównaniu do osób z zespołem parkinsonowskim nie osiągała istotności statystycznej.

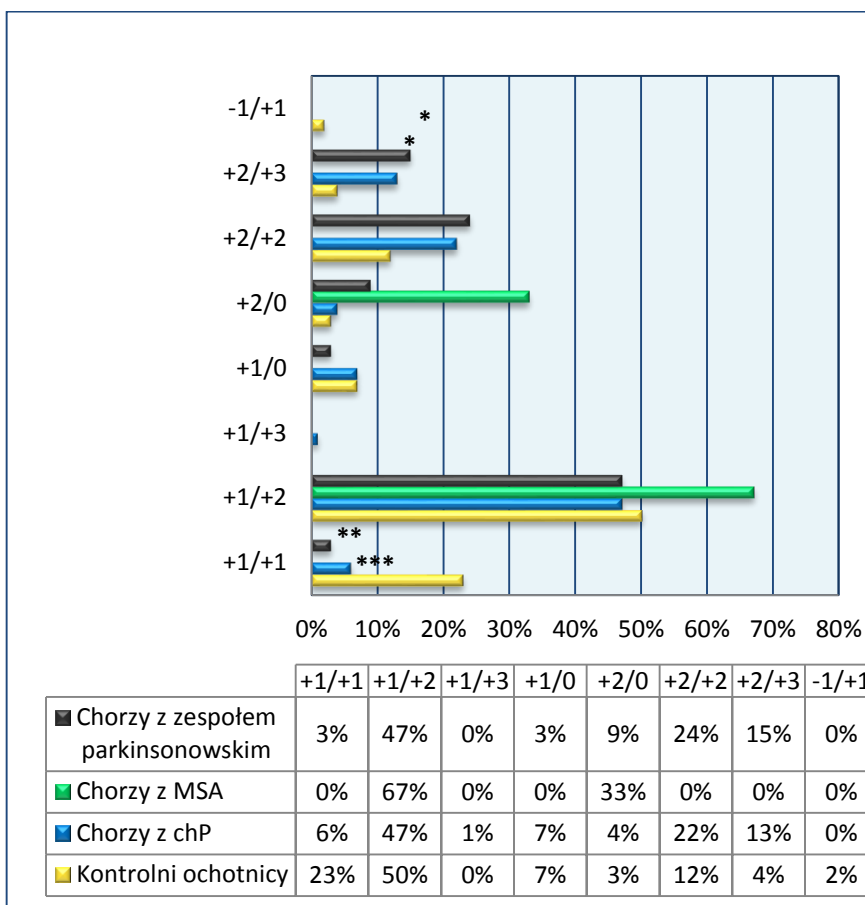
W odróżnieniu od allelu +1, allel +2 występował najczęściej u chorych z zespołem parkinsonowskim i z mniejszą częstością u chorych z chP (chP; test dla dwóch składników struktury,  $p < 0,01$  w porównaniu do kontrolnych ochotników). Ponadto, podobnie, jak w przypadku allelu +1, częstość występowania allelu +2 u chorych z chP i z zespołem parkinsonowskim nie różniła się istotnie statystycznie.

Allel +3 występował z jednakową częstością u chorych z chP i zespołem parkinsonowskim, i w obu grupach chorych z istotnie wyższą częstością w porównaniu do kontrolnych ochotników (test dla dwóch składników struktury,  $p < 0,05$ ). Obecność allelu -1 wykazano jedynie u kontrolnych ochotników.

Ze względu na małą liczebność grupy chorych z MSA, wyników badań nie oceniano statystycznie. U tych chorych dokonano jedynie oceny częstości

występowania oznaczonych alleli 0, +1 i +2. Allel +1 u chorych z MSA występował z jednakową częstością, w porównaniu z chorymi z chP i z podobną częstością, jak u chorych z rozpoznaniem zespołem parkinsonowskim, oraz wykazywał tendencję spadkową w porównaniu do kontrolnych ochotników. Natomiast częstość występowania allelu +2 u chorych z MSA wykazywała tendencję wzrostową w porównaniu do kontrolnych ochotników oraz spadkową w stosunku do osób z pozostałych analizowanych grup chorych. Natomiast allel 0 u tych chorych występował z trzykrotnie wyższą częstością w porównaniu z innymi badanymi osobami z analizowanych grup (Ryc. 32).

W celu weryfikacji uzyskanych wyników badań alleli regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA* u osób badanych i kontrolnych przeprowadzono również analizę genotypów tego regionu (Ryc. 33).



Ryc. 33. Częstość występowania poszczególnych genotypów regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA* w grupie osób badanych i kontrolnych. Zastosowano test dla dwóch składników struktury, statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności:

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  w porównaniu z kontrolą.

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że u kontrolnych ochotników genotyp +1/+1 regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA* występował z wielokrotnie większą częścią niż u chorych z chP i z zespołem parkinsonowskim (test dla dwóch składników struktury; chP,  $p < 0,001$ ; zespół parkinsonowski,  $p < 0,01$ ). Natomiast u badanych chorych z MSA nie wykazano obecności tego genotypu.

Częstość występowania genotypu +1/+2 tego genu miała tendencję wzrostową jedynie u chorych z MSA w porównaniu do kontrolnych ochotników, natomiast u osób z pozostałych analizowanych grup chorych była na podobnym poziomie. Jednocześnie, u chorych z MSA nie wykazano obecności genotypów zarówno +1/0, +2/+2, jak i +2/+3. Genotyp +1/0 występował z mniejszą częstością jedynie u osób z zespołem parkinsonowskim, a genotyp +2/+2 dwukrotnie częściej u chorych z zespołem parkinsonowskim i prawie dwukrotnie częściej w chP w porównaniu do kontrolnych ochotników, osiągając w tych grupach chorych poziomy bliskie istotności statystycznej (test dla dwóch składników struktury,  $p = 0,056$ ). Natomiast genotyp +2/+3 występował z ponad trzykrotnie większą częstością zarówno u chorych z chP (test dla dwóch składników struktury,  $p < 0,05$ ), jak i z zespołem parkinsonowskim (test dla dwóch składników struktury,  $p < 0,05$ ) w porównaniu do kontrolnych ochotników. Ponadto, obecność genotypu +1/+3 wykazano jedynie u jednego chorego z chP, natomiast obecność genotypu -1/+1 jedynie u dwóch kontrolnych ochotników.

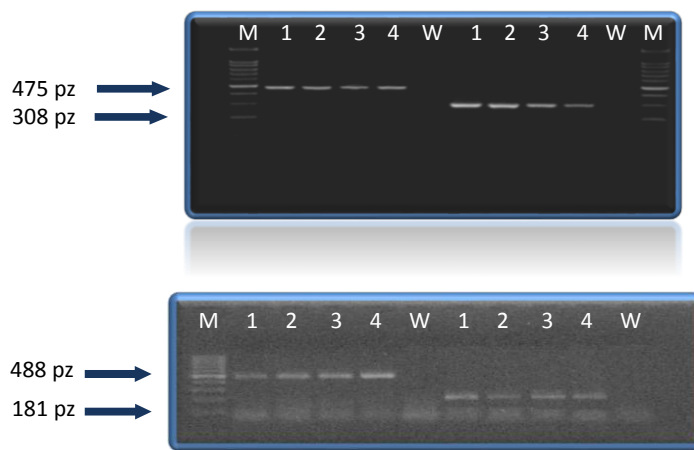
## ***4.2. ANALIZA DELECJI I MUTACJI PUNKTOWYCH GENU PRKN***

Najczęściej u chorych z chP wykonuje się badania na obecność mutacji punktowych i delecji w genie *PRKN*.

### **4.2.1. ANALIZA CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA DELECJI EKSONÓW 2 I 4 GENU PRKN**

Przykładowy wynik analizy występowania delecji eksonów 2 i 4 genu *PRKN* przedstawia rycina 34.

W wyniku przeprowadzonych badań nie wykryto obecności delecji eksonów 2 i 4 genu *PRKN* u żadnej z osób badanych i kontrolnych.

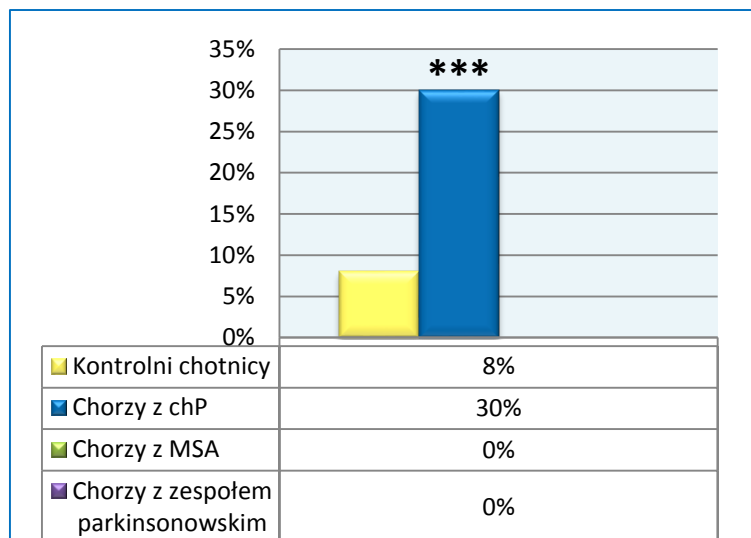


Ryc. 34. Przykładowe rozdziały elektroforetyczne produktów reakcji PCR przeprowadzonej z zastosowaniem starterów wewnętrznych i zewnętrznych dla eksonów 2 i 4 genu *PRKN*. M- marker wielkości DNA, 1-4 produkty reakcji PCR, prążek odpowiadający produktowi o większej masie stanowi produkt reakcji z zastosowaniem starterów zewnętrznych, prążek odpowiadający produktowi o mniejszej masie – produkt reakcji z zastosowaniem starterów wewnętrznych, W- kontrola ujemna reakcji PCR.

#### 4.2.2. ANALIZA CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA MUTACJI PUNKTOWYCH W EXONACH 2, 4, 7, 8, 11 GENU *PRKN*

W wyniku przeprowadzonych analiz na obecność mutacji punktowych w exonach 2, 4, 7, 8, 11 genu *PRKN* wykazano prawie czterokrotnie większą częstość występowania tych mutacji u chorych z chP w porównaniu do kontrolnych ochotników (test Chi2,  $p < 0,001$ ) [Ryc. 35]. Jednocześnie nie wykazano obecności żadnej z analizowanych mutacji punktowych genu *PRKN* u pozostałych chorych z zaburzeniami układu pozapiramidowego.

Ponadto, wszystkie oznaczone mutacje w genie *PRKN* były mutacjami typu zmiany sensu związanej z substytucjami aminokwasów i występowały w konfiguracji heterozygotycznej.

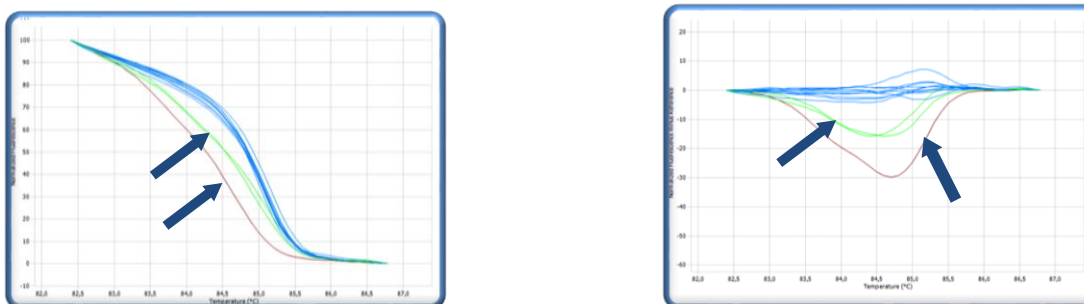


Ryc. 35. Odsetek mutacji punktowych wykrytych w genie *PRKN* u osób badanych i kontrolnych, statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności - \*\*\* $p < 0,001$ .

Uwzględniając częstość występowania mutacji w genie *PRKN*, analizę eksonów 4, 7 i 11 oraz 2 i 8 tego genu przeprowadzono różnymi technikami.

#### 4.2.2.1 ANALIZA MUTACJI W EKSONACH 4, 7 I 11 GENU *PRKN*

Przykładowe wyniki analizy przesiewowej mutacji w eksonach 4, 7 i 11 genu *PRKN* dla metody HRM przedstawiono na rycinie 36 oraz dla sekwencjonowania na rycinach 37-40.

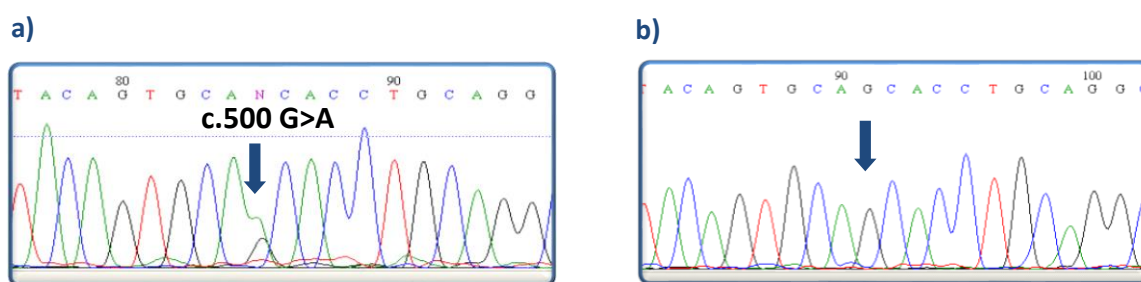


Ryc. 36. Przykładowe wyniki analizy HRM dla eksonu 4 genu *PRKN*. Strzałkami zaznaczono krzywe wskazujące na obecność mutacji w analizowanym eksonie.

W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano dwie mutacje w obrębie eksonu 4, mutacje do tej pory opisaną (c.500G>A *PRKN*) i nieopisaną (c.520C>T *PRKN*) w piśmiennictwie oraz po jednej mutacji w obrębie eksonów: 7 (c.823 C>T *PRKN*) i 11 (c.1180 G>A *PRKN*) genu kodującego białko parkinę (*PRKN*).

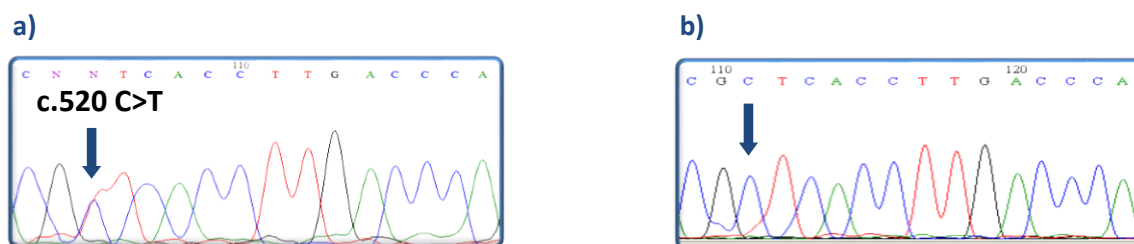
Częstość występowania zidentyfikowanych mutacji w genie *PRKN* oraz oczekiwaną częstość ich występowania obliczoną zgodnie z prawem Hardy-Weinberga zestawiono w tabeli 18 oraz na rycinie 41.

Jak wynika z tabeli 18 oznaczona w eksonie 4 genu *PRKN* tranzycja G>A w pozycji c.500 związana była z zamianą aminokwasu seryny (S) na asparaginę (A) w kodonie 167 (AGC→AAC) białka parkiny (Ryc. 37). Ponadto, wykazano, że mutacja ta występowała z 7% częstością u chorych z chP i pojawiała się u tych chorych siedmiokrotnie częściej w porównaniu do kontrolnych ochotników (dokładny test Fishera,  $p < 0,05$ ).



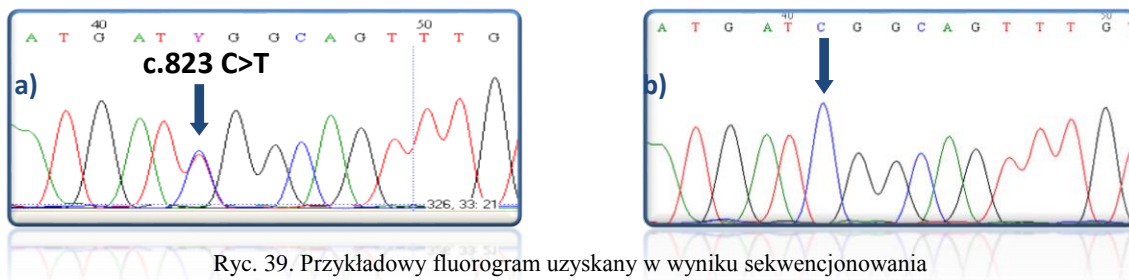
Ryc. 37. Przykładowy fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 4 genu *PRKN* a) mutację c.500 G>A *PRKN* zaznaczono strzałką, b) wynik prawidłowy.

Ponadto u 2% chorych z chP wykazano obecność tranzycji C>T w pozycji c.520 genu *PRKN* w eksonie 4 związanej z zamianą aminokwasu leucyny (L) na fenyloalaninę (F) w kodonie 174 (CTC→TTC) białka parkiny (Ryc. 38). Mutacja ta występowała jedynie w tej grupie chorych.



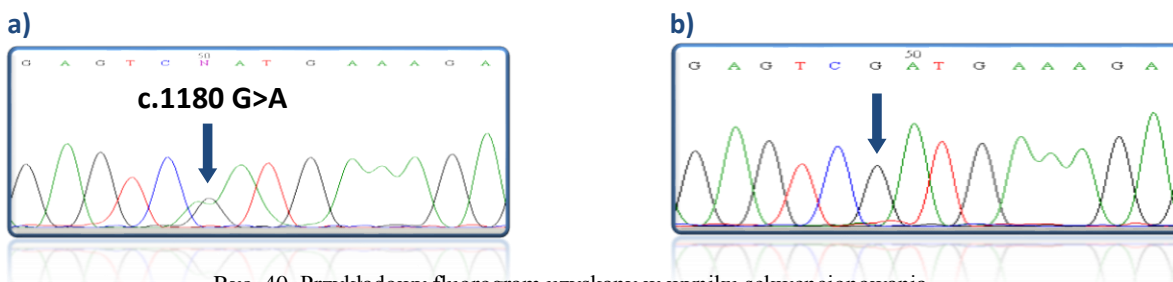
Ryc. 38. Przykładowy fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 4 genu *PRKN* a) mutację c.520 C>T zaznaczono strzałką, b) wynik prawidłowy.

U 1% chorych z chP wykazano obecność tranzycji C>T w pozycji c.823 genu *PRKN* eksonu 7 powodującej substytucję aminokwasu argininy (R) przez tryptofan (T) w kodonie 275 (CGG→TGG) [Ryc. 39]. Podobnie jak mutacje oznaczone w eksonie 4, mutacja c.823 C>T *PRKN* w eksonie 7 występowała jedynie u chorych z chP.



Ryc. 39. Przykładowy fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 7 genu *PRKN* a) mutację c.823 C>T zaznaczono strzałką, b) wynik prawidłowy.

Ponadto w eksonie 11 genu *PRKN* zidentyfikowano tranzycję G>A w pozycji c.1180 związaną z zamianą aminokwasów: asparaginianu (D) na N w kodonie 394 (GAT→AAT) [Ryc. 40]. Wykazano, że mutacja ta występowała u 11% chorych z chP oraz u tych osób z ponad pięciokrotnie większą częstością w porównaniu do kontrolnych ochotników (test Chi2, p<0,01).

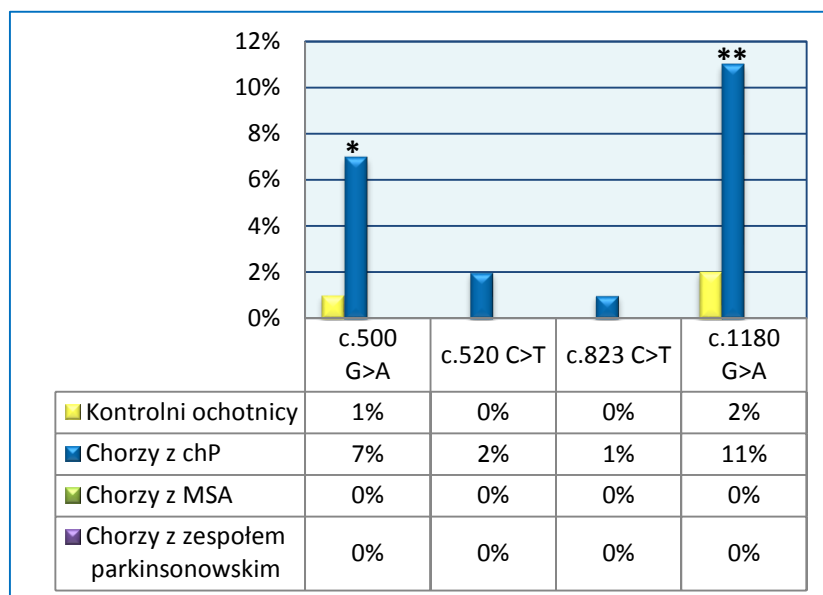


Ryc. 40. Przykładowy fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 11 genu *PRKN* a) mutację c.1180 G>A zaznaczono strzałką, b) wynik prawidłowy.

Tab. 18. Liczba mutacji w eksonach 4, 7 i 11 genu *PRKN* w poszczególnych analizowanych grupach osób, stwierdzona i obliczona z prawa Hardy-Weinberga

	c.500 G>A, g.0531638 G>A, rs 1801474, S167N		c.520 C>T g.0531658 C>T L174F		c.823 C>T g.0946983 C>T rs 34424986 R275W		c.1180 G>A g.1372610 G>A rs 1801334 D394N		Liczba badanych osób
	Liczebność stwierdzona	Liczebność oczekiwana	Liczebność stwierdzona	Liczebność oczekiwana	Liczebność stwierdzona	Liczebność oczekiwana	Liczebność stwierdzona	Liczebność oczekiwana	
<b>Kontrolni ochotnicy</b>	<b>1</b>	1	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	<b>2</b>	1,98	113
<b>Chorzy z chP</b>	<b>6</b>	5,80	<b>2</b>	1,98	<b>1</b>	0,99	<b>10</b>	9,44	90
<b>Chorzy z MSA</b>	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	3
<b>Chorzy z zespołem parkinsonowskim</b>	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	35

Nomenklaturę mutacji podano w odniesieniu do sekwencji referencyjnych: NM\_004562, NG\_004562, NP\_004553 [http://www.ensembl.org].

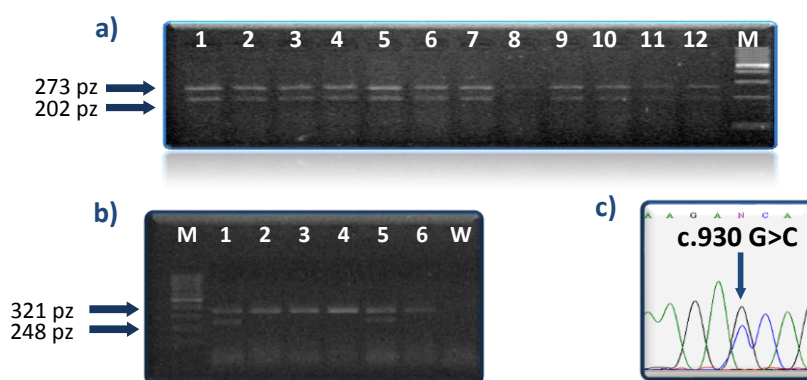


Ryc. 41. Odsetek osób z poszczególnymi mutacjami genu *PRKN* w eksonach 4, 7 i 11 w poszczególnych grupach osób badanych i kontrolnych, statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  w porównaniu z kontrolą.

#### 4.2.2.2 ANALIZA WYSTĘPOWANIA MUTACJI PUNKTOWYCH W EKSONACH 2 I 8 GENU *PRKN*

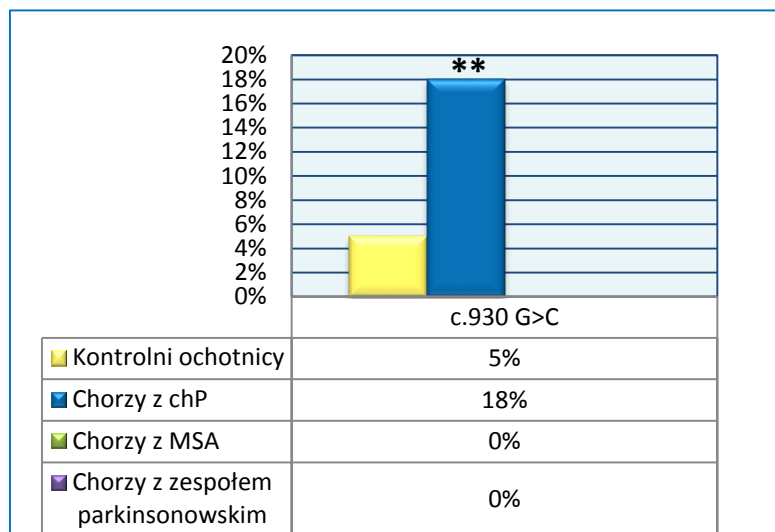
W badanej grupie osób nie wykazano obecności mutacji c.110 C>T i c.111 G>A w eksonie 2 genu *PRKN* oraz stwierdzono obecność mutacji c. 930G>C w eksonie 8 tego genu.

Przykładowe wyniki analizy restrykcyjnej mutacji c.110 C>T i c.111 G>A w eksonie 2 oraz mutacji c. 930G>C w eksonie 8 genu *PRKN* wraz z wynikiem sekwencjonowania (w eksonie 8) przedstawiono na rycinie 42.



Ryc. 42. Przykładowe wyniki analizy mutacji w eksonach 2 i 8 genu *PRKN*: a) rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR/RFLP eksonu 2 z zastosowaniem enzymu *Hae*III b) rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR/RFLP eksonu 8 z zastosowaniem enzymu *Mva*I, M- marker, 1-12, 1-6 – produkty reakcji, W kontrola ujemna reakcji c) fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 8 genu *PRKN*, mutacja c.930 G>C zaznaczona strzałką.





Ryc. 43. Częstość występowania mutacji c.930 G>C genu *PRKN* u osób badanych i kontrolnych, statystycznie istotne różnice przy poziomie istotności  $^{**}p<0,001$  w porównaniu z kontrolą.

Tab. 19. Liczba osób z mutacjami w eksonach 2 i 8 w poszczególnych grupach badanych stwierdzona empirycznie i obliczona z prawa Hardyego-Weinberga

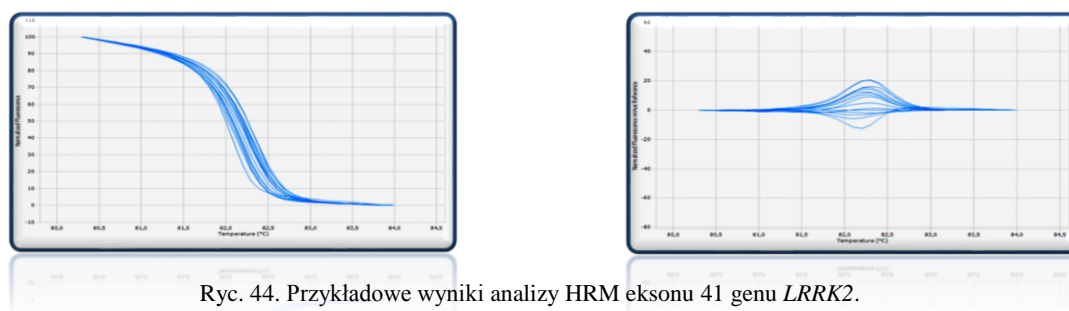
	c.110 C>T ex.2		c.111 G>A ex.2		c.930 G>C ex.8		Liczba badanych osób (dla ex.8)
	Liczebność stwierdzona	Liczebność oczekiwana	Liczebność stwierdzona	Liczebność oczekiwana	Liczebność stwierdzona	Liczebność oczekiwana	
<b>Kontrolni ochotnicy</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	6	<b>5,84</b>	<b>113 (112)</b>
<b>Chorzy z chP</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	14	<b>12,73</b>	<b>90 (77)</b>
<b>Chorzy z MSA</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	<b>3 (2)</b>
<b>Chorzy z zespołem parkinsonowskim</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>	<b>35 (31)</b>

U 18% chorych z chP wykazano obecność mutacji c. 930G>C genu *PRKN* związanej z zamianą aminokwasów: glutaminianu (E) na D w kodonie 310 (GAG→GAC). Mutacja ta występowała z ponad trzykrotnie większą częstością u chorych z chP w porównaniu do kontrolnych ochotników (test Chi2,  $p<0,01$ ).

### 4.3. ANALIZA MUTACJI PUNKTOWYCH W OBRĘBIE EKSONU 41 GENU *LRRK2*

Badania mutacji w eksonie 41 genu *LRRK2* przeprowadzono ze względu na pojawiające się w piśmiennictwie rozbieżności w częstości ich występowania na świecie i w Polsce.

Przykładowe wyniki analizy mutacji w eksonie 41 genu *LRRK2* przedstawiono na rycinie 44.



Ryc. 44. Przykładowe wyniki analizy HRM eksonu 41 genu *LRRK2*.

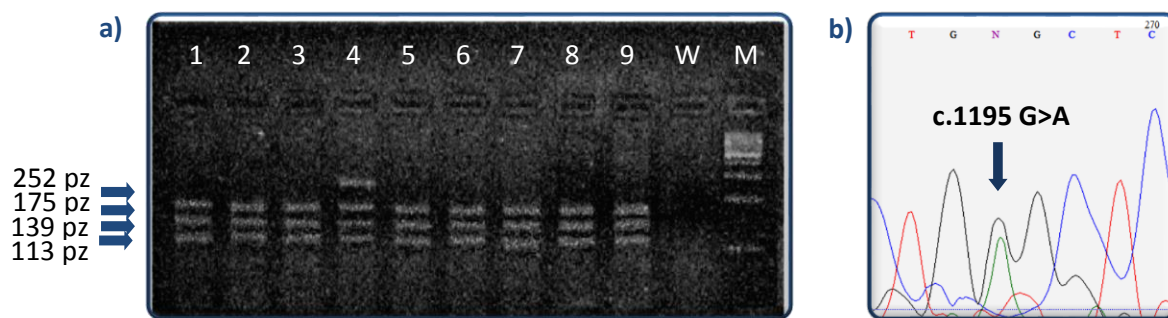
Nie odnotowano występowania krzywych odbiegających od normy.

W wyniku przeprowadzonych badań nie wykryto obecności mutacji punktowych w eksonie 41 genu *LRRK2* u żadnej osoby badanej i kontrolnej.

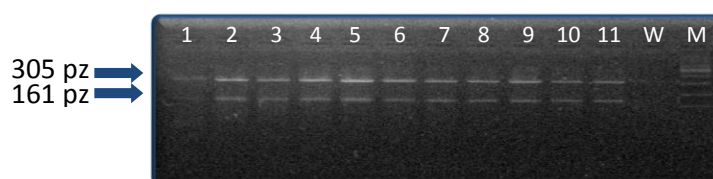
### 4.4. ANALIZA WYSTĘPOWANIA MUTACJI PUNKTOWYCH GENU *HTRA2*

Analizie poddano mutacje c.421 G>T, c.1195 G>A, c.1210 C>T genu *HTRA2* charakterystyczne dla rasy kałkaskiej [145].

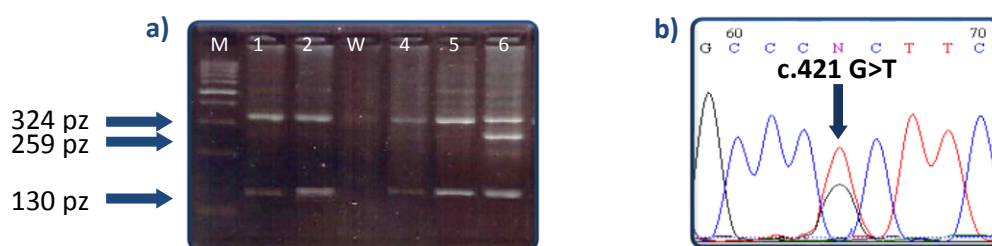
W przeprowadzonych badaniach nie wykazano obecności mutacji c.1210 C>T genu *HTRA2*. Jednocześnie u badanych osób wykazano obecność mutacji: c.421 G>T, c.1195 G>A w tym genie. Przykładowe rozdziały elektroforetyczne oraz fluor ogramy z przebiegu sekwencjonowania genu *HTRA2* przedstawiono na rycinach 45- 47, a częstość występowania oznaczonych mutacji przedstawiono na rycinie. 48.



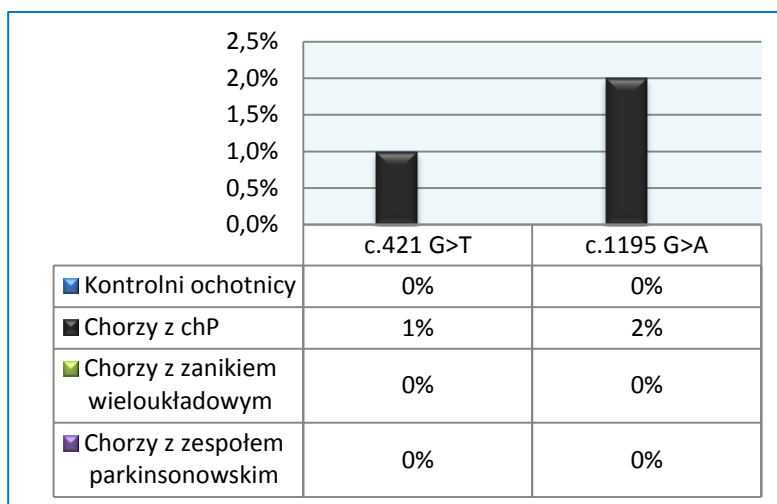
Ryc. 45. a) Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR/RFLP eksonu 7 genu *HTRA2*,  
 b) Fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 7 genu *HTRA2*  
 chorego z mutacją c.1195 G>A zaznaczoną strzałką.  
 M - marker wielkości DNA, 1-3,5-9 - próbki bez mutacji c.1195 G>A, 4- próbka z mutacją c.1195 G>A,  
 W - kontrola ujemna



Ryc. 46. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR/RFLP eksonu 7 genu *HTRA2*.  
 M - marker wielkości DNA, 1-11 - próbki bez mutacji c.1210 C>T, W - kontrola ujemna.



Ryc. 47. a) Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR/RFLP eksonu 1 genu *HTRA2*.  
 b) Fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 1 genu *HTRA2*  
 chorego z mutacją c.421 G>T zaznaczoną strzałką.  
 M - marker wielkości DNA, 1, 2, 4, 5- próbki bez mutacji c.421 G>T, 6- próbka z mutacją c.421 G>T,  
 W - kontrola ujemna



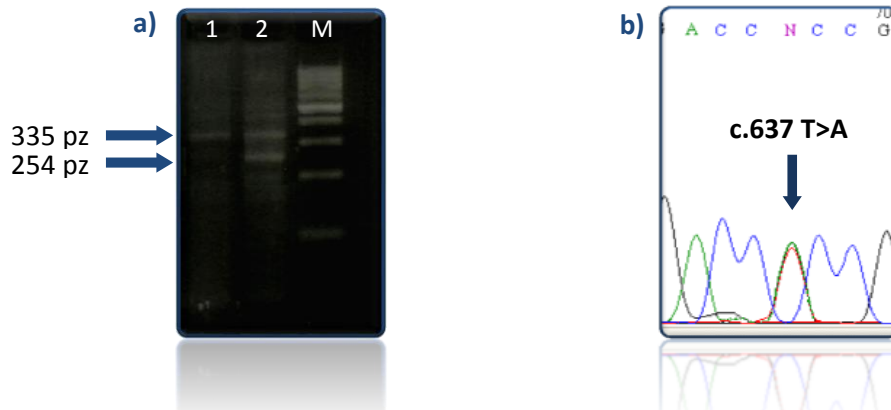
Ryc. 48. Odsetek mutacji c.421 G&gt;T i c.1195 G&gt;A u chorych z chP.

U 1% chorych z chP wykazano obecność mutacji c.421 G>T *HTRA2* związanej z substytucją A na S w pozycji 141, a u kolejnych 2% osób z chP stwierdzono obecność mutacji c.1195 G>A *HTRA2* związanej z zamianą aminokwasów G na S w pozycji 399.

#### 4.5. ANALIZA WYSTĘPOWANIA MUTACJI W OBRĘBIE KODONU *SPR*

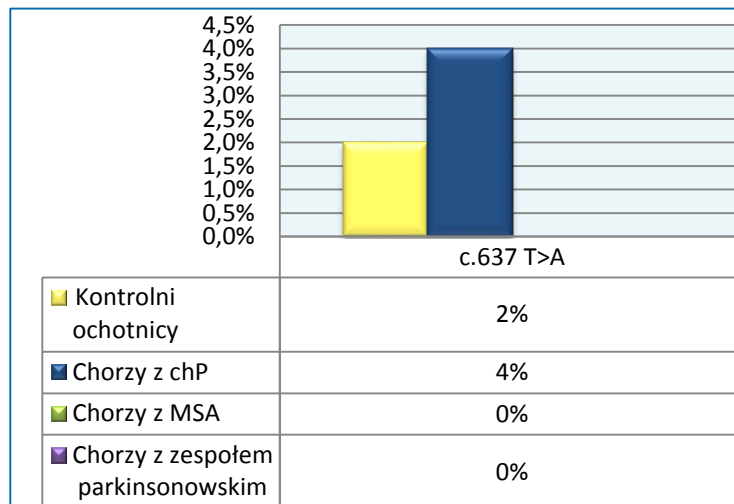
Analizie poddano mutacje w kodonie 213 genu *SPR*, ze względu na najbardziej prawdopodobne miejsce wystąpienia mutacji.

W przeprowadzonych badaniach nie wykazano obecności mutacji c.637 T>G genu *SPR*. Jednocześnie u 4% chorych z chP i 2% kontrolnych ochotników wykazano obecność nieopisaną do tej pory w piśmiennictwie mutacji: **c.637 T>A *SPR*** związanej z zamianą S na T w kodonie 213. Przykładowy rozdział elektroforetyczny oraz fluorogram z przebiegu sekwencjonowania genu *SPR* przedstawiono na rycinie 49 A i B, a częstość występowania oznaczonej mutacji przedstawiono na rycinie 50.



Ryc. 49. a) Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR/RFLP genu *SPR*,  
 b) Fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 3 genu *SPR*  
 chorego z mutacją c.637 T>A zaznaczoną strzałką.

M – marker wielkości DNA, 1– próbka bez mutacji c.637 T>A, 2- próbka z mutacją c.637 T>A.

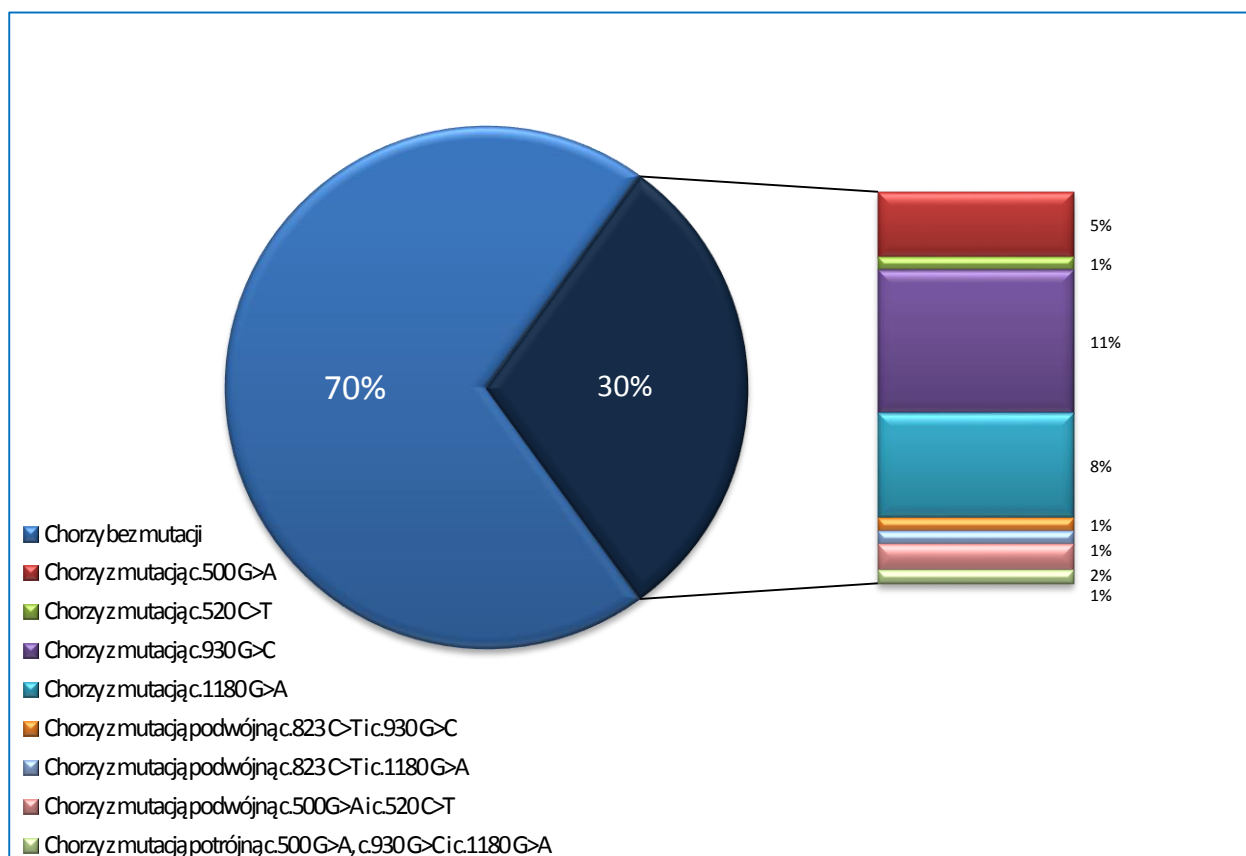


Ryc. 50. Odsetek osób z wykrytą mutacją w genie *SPR* u osób badanych i kontrolnych.

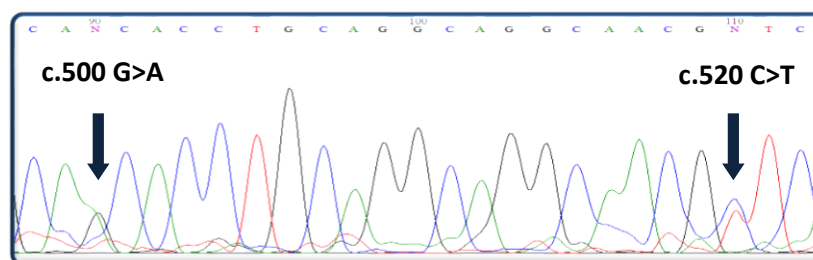
## 4.6. WSPÓŁWYSTĘPOWANIE MUTACJI PUNKTOWYCH W ANALIZOWANYCH GENACH PARK

### 4.6.1. ANALIZA WSPÓŁWYSTĘPOWANIA WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ MUTACJI PUNKTOWEJ W GENIE *PRKN*

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że u pięciu chorych z chP (5%) w genie *PRKN* występowały mutacje wielokrotne (Ryc. 51). U czterech z nich były to mutacje podwójne, u dwóch osób obie występowały w eksonie 4 (c.500 G>A i c.520 C>T) [Ryc. 52]; u jednej, w eksonach 7 (c.823 C>T) i 8 (c.930 G>C); u kolejnej w eksonach 7 (c.823 C>T) i 11 (c.1180 G>A). Natomiast u jednej osoby wykazano obecność trzech mutacji genu *PRKN* (c.500 G>A, c.930 G>C, c.1180 G>A), kolejno w eksonach 4, 8, 11 (Tab. 21).



Ryc. 51. Odsetek chorych z chP, u których wykazano obecność mutacji *PRKN*.



Ryc. 52. Przykładowy fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 4 u chorego z podwójną mutacją genu *PRKN*. Strzałkami zaznaczono miejsca substytucji nukleotydów.

#### 4.6.2. ANALIZA WSPÓŁWYSTĘPOWANIA MUTACJI PUNKTOWYCH GENU *PRKN* I POLIMORFIZMU REGIONU NACP-REP1 PROMOTORA GENU *SNCA*

Jednoczesna analiza mutacji genu *PRKN* i polimorfizmu regionu NACP-Rep1 genu *SNCA* wykazała, że zarówno u chorych z chP (17%), jak i u osób kontrolnych (6%) mutacjom w genie *PRKN* najczęściej towarzyszyła obecność genotypu +1/+2. W chP, pozostałe oznaczone genotypy analizowanego odcinka promotorowego występowały z wielokrotnie niższą częstością wynosily od 4%, dwukrotnie 3% do 2%, dla genotypów +2/+2, +2/+3 i +1/0 oraz +1/+1, odpowiednio. Natomiast u osób kontrolnych nie wykazano współistnienia mutacji genu *PRKN* z genotypami +2/+2, +2/+3. Szczegółowe dane dotyczące rodzaju oznaczonych mutacji w genie *PRKN* współistniejących z poszczególnymi genotypami u chorych z chP i u kontrolnych ochotników zamieszczono w tabelach (Tab. 20 i Tab. 21).

Tab. 20. Genotyp regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA* u osób, u których wykazano współistnienie mutacji punktowych w genach PARK

Grupa	Gen z mutacją punktową	Genotyp NACP-Rep1	Liczba osób /(odsetek)
<b>chP</b>	<i>PRKN</i>	+2/+3	3 (3%)
	<i>PRKN</i>	+2/+2	4 (4%)
	<i>PRKN</i>	+1/0	3 (3%)
	<i>PRKN</i>	+1/+1	2 (2%)
	<i>PRKN</i>	+1/+2	15 (17%)
<b>K</b>	<i>PRKN</i>	+1/0	1 (1%)
	<i>PRKN</i>	+1/+1	1 (1%)
	<i>PRKN</i>	+1/+2	7 (6%)
<b>chP</b>	<i>SPR</i>	+1/+2	4 (4%)
<b>K</b>	<i>SPR</i>	+1/+2	2 (2%)
<b>chP</b>	<i>HTRA2</i>	+1/0	1 (1%)
	<i>HTRA2</i>	+1/+2	2 (2%)

chP – chorzy z chorobą Parkinsona,

K – kontrolni ochotnicy.



Tab. 21. Genotyp regionu NACP-Rep1 u osób u których wykazano obecność mutacji punktowych

Nr próby	Płeć	Wiek	Genotyp NACP-Rep1	Mutacja punktowa	
Chorzy z chP	1	K	66	+2/+3	c. 930G>C (PRKN)
	2	K	76	+2/+3	c. 930G>C (PRKN)
	3	K	59	+1/+1	c. 930G>C (PRKN)
	4	M	69	+2/+2	c. 930G>C (PRKN)
	5	K	71	+1/+2	c.500 G>A (PRKN)
	6	M	51	+1/+2	c. 930G>C (PRKN)
	7	M	55	+2/+2	c. 930G>C (PRKN)
	8	K	62	+1/+2	c. 930G>C (PRKN)
	9	K	65	+1/+2	c. 930G>C (PRKN)
	10	M	66	+1/+2	c. 930G>C (PRKN)
	11	M	59	+1/+2	c.500 G>A (PRKN)
	12	M	68	+1/+2	c.500 G>A (PRKN)
	13	K	46	+1/+2	c.520 C>T (PRKN)
	14	K	59	+1/+2	c. 1180G>A (PRKN)
	15	M	61	+2/+3	c. 1180G>A (PRKN)
	16	M	41	+1/0	c. 930G>C (PRKN)
	17	K	57	+1/+2	c. 930G>C (PRKN)
	18	K	68	+1/+1	c. 1180G>A (PRKN)
	19	K	73	+1/+2	c. 930G>C (PRKN)
	20	M	67	+1/+2	c. 637T>A (SPR)
	21	M	62	+1/+2	c. 637T>A (SPR)
	22	K	65	+1/+2	c. 637T>A (SPR)
	23	M	69	+1/+2	c.1195 G>A (HTRA2)
	24	K	62	+1/+2	c.500 G>A, c. 930G>C, c. 1180G>A (PRKN)
	25	K	63	+2/+2	c. 823C>T, c. c. 930G>C (PRKN)
	26	K	49	+1/0	c. 930G>C, c. 1180G>A (PRKN)
	27	M	73	+1/+2	c. 930G>C, c. 1180G>A (PRKN)
	28	M	46	+2/+2	c.500 G>A, c.520 C>T (PRKN)
	29	K	54	+1/+2	c.500 G>A (PRKN), c. 637T>A (SPR)
	30	M	67	+1/+2	c. 930G>C (PRKN), c.1195 G>A (HTRA2)
	31	K	51	+1/0	c. 930G>C (PRKN), c.421 G>T (HTRA2)
Kontrolni ochotnicy	32	K	52	+1/+2	c. 930G>C (PRKN)
	33	K	40	+1/+2	c. 1180G>A (PRKN)
	34	K	52	+1/+2	c. 930G>C (PRKN)
	35	M	50	+1/+2	c. 930G>C (PRKN), c. 637T>A (SPR)
	36	M	47	+1/+2	c. 637T>A (SPR)
	37	K	66	+1/+2	c.500 G>A (PRKN)
	38	K	39	+1/+1	c. 930G>C (PRKN)
	39	M	70	+1/+2	c. 930G>C (PRKN)
	40	M	69	+1/0	c. 930G>C (PRKN)
	41	M	61	+1/+2	c. 1180G>A (PRKN)

4.6.3. ANALIZA WSPÓŁWYSTĘPOWANIA POLIMORFIZMU  
REGIONU NACP-REP1 GENU SNCA Z MUTACJAMI  
W GENIE HTRA2 LUB SPR

Jednoczesna analiza mutacji genu *SPR* i polimorfizmu regionu NACP-Rep1 genu *SNCA* wykazała, że zarówno u chorych z chP (4%), jak i u osób kontrolnych (2%) mutacjom w genie *SPR*, niezależnie czy współwystępowała z nimi mutacja w genie *PRKN* zawsze towarzyszyła obecność genotypu +1/+2. W przypadku genu *HTRA2* u chorych z chP współwystępowanie genotypu NACP-Rep1 genu *SNCA* było zależne od rodzaju występującej mutacji *HTRA2*, mutacja c.1195G>A współistniała, podobnie jak w przypadku genu *SPR* z genotypem +1/+2 (niezależnie czy współwystępowała z nimi mutacja w genie *PRKN*), natomiast c.421G>T (z c.1180 G>A *PRKN*) współwystępowała z genotypem +1/0 (Tab. 20).

Współistnienie mutacji w genach *PRKN* i *HTRA2* lub *SPR* zarówno u chorych z chP, jak i osób kontrolnych do tej pory nie było opisywane w piśmiennictwie.

**4.7. OCENA WPŁYWU MUTACJI W ANALIZOWANYCH GENACH  
PARK NA RYZYKO UJAWNIEŃ SIĘ CHOROBY PARKINSONA**

Zestawienie wpływu oznaczonych mutacji w badanych genach PARK na ryzyko ujawnienia się chP wyznaczone w oparciu o analizę regresji logistycznej przedstawiono w tabeli 22.

Tab. 22. Wpływ oznaczonych mutacji punktowych genów *PRKN*, *HTRA2* i *SPR* na ryzyko ujawnienia się choroby Parkinsona wyrażone ilorazem szans

Substytucja	P	OR
<b>c.500 G&gt;A PRKN</b>	<b>0,025</b>	<b>8,000</b>
c.520 C>T PRKN	0,111	6,412
c.823 C>T PRKN	0,261	3,804
<b>c.930 G&gt;C PRKN</b>	<b>0,005</b>	<b>3,926</b>
<b>c.1180 G&gt;A PRKN</b>	<b>0,005</b>	<b>6,938</b>
<b>PRKN</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>6,059</b>
c.421 G>T HTRA2	0,261	3,804
c.1195 G>A HTRA2	0,111	6,412
<b>HTRA2</b>	<b>0,050</b>	<b>9,080</b>
c.637 T>A SPR	0,257	2,612

OR- iloraz szans, p- poziom istotności w teście dokładnym Fishera.

Wyniki badań statystycznych wskazują, że na ryzyko wystąpienia chP w populacji polskiej najsilniej wpływa obecność mutacji w genie *PRKN* (dokładny test Fischera,  $p < 0,001$ ; OR=6,059) i jest ona zasadniczo zależna od lokalizacji mutacji w genie. Największe ryzyko chP wiąże się z lokalizacją w eksonie: 4 (dokładny test Fischera,  $p < 0,05$ ; OR=8,000), następnie 11 (dokładny test Fischera,  $p < 0,001$ ; OR=6,938) i 8 (dokładny test Fischera,  $p < 0,001$ ; OR=3,926) tego genu.

Mutacje w genie *HTRA2* (dokładny test Fischera,  $p = 0,05$ ; OR=9,080) mogą wskazywać na wystąpienie jedynie predyspozycji do zachorowania na chP.

### 4.7.1. OCENA ZALEŻNOŚCI POMIĘDZY MUTACJAMI W ANALIZOWANYCH GENACH PARK A ROZWOJEM CHOROBY PARKINSONA

W wyniku przeprowadzonej analizy korelacji pomiędzy występowaniem pojedynczej lub wielokrotnej mutacji w analizowanych genach PARK, a stopniem zaawansowania choroby chP wykazano ujemną korelację u osób chorujących powyżej 10 lat, między występowaniem substytucji c.930 G>C genu *PRKN*, a stopniem zaawansowania choroby w skali Hoehn–Yahra (1 i 2 stopień rozwoju choroby) [korelacja Spearmana,  $R = -0,458$ ;  $p < 0,05$ ]. Podobną zależność u osób z chP chorujących dłużej niż 10 lat, wykazano dla allelu 0 regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA* (korelacja Spearmana,  $R = -0,507$ ;  $p < 0,05$ ) oraz dla mutacji c.1195 G>A genu *HTRA2* w populacji ogólnej (korelacja Spearmana,  $R = -0,237$ ;  $p < 0,05$ ) [Tab. 23]. Jednocześnie u pozostałych badanych chorych z chP posiadających mutacje *PRKN* zasadniczo obserwowano tendencję do wolniejszego postępu choroby w skali Hoehn–Yahra (mutacja w eksonie 4: 71% chorych z 2 stopniem; w eksonie 7: 100% z 1 stopniem; w eksonie 8: 29% z 1 stopniem i 57% z 2 stopniem; oraz w eksonie 11: 22% z 1 stopniem i 56% z 2 stopniem).

Ponadto u chorych z chP z genotypem +1/+1 regionu NACP-Rep1 promotora *SNCA* obserwowano wolniejszy postęp choroby w skali Hoehn-Yahra (40% z 1 stopniem i 40% z 2 stopniem) a u osób z genotypem +2/+2 choroba postępowała najszybciej (40% z 3-4 stopniem).

Tab. 23. Korelacja pomiędzy obecnością oznaczonych mutacji/polimorfizmów w genach PARK i stopniem zaawansowania choroby Parkinsona w skali Hoehn-Yahra

Chorzy z chorobą Parkinsona				
Oznaczona mutacja/polimorfizm	Czas trwania choroby			Poziom istotności (p)
	poniżej 5 lat	od 5 do 10 lat	powyżej 10 lat	
<b>c.930 G&gt;C PRKN</b>	-	-	<b>R -0,458</b>	<b>0,049</b>
<b>allel 0 NACP-Rep1</b>	-	-	<b>R -0,507</b>	<b>0,019</b>

R- współczynnik korelacji Spearmana podany dla  $p < 0,05$

U chorych z chP chorujących dłużej niż 10 lat wykazano dodatnią korelację między występowaniem substytucji c.500 G>A w genie *PRKN*, a odpowiedzią na farmakoterapię L-dopą, natomiast dla substytucji c.930 G>C *PRKN* zależność ta mieściła się jedynie na granicy istotności statystycznej. Jednocześnie stwierdzono, że obecność polimorfizmu c.1180 G>A *PRKN* u chorych z chP dodatnio korelowała z odpowiedzią na farmakoterapię L-dopą już we wczesnym okresie trwania choroby (poniżej 5 lat) [Tab. 24]. Wykazano również, że obecność więcej niż jednej mutacji w genie *PRKN* nie wpływała znacząco na skuteczność terapii L-dopą (wysokość stosowanych dawek L-dopy).

U chorych z chP z genotypem regionu NACP-Rep1 wykazano, że wysokość stosowanych u tych chorych dawek L-dopy była najniższa u chorych z genotypem +1/+1 niezależnie od czasu trwania choroby i wiązała się z dobrą odpowiedzią na terapię, w odróżnieniu od chorych z genotypem +2/+3, którzy najgorzej reagowali na terapię tym prekursorem DA (różnice nieistotne statystycznie). Ponadto bardzo dobrą odpowiedź na terapię L-dopą wykazano u 16% chorych z chP z genotypem +2/+2 w okresie trwania choroby poniżej 5 lat.

Tab. 24. Korelacja pomiędzy obecnością oznaczonych mutacji w genie *PRKN* i odpowiedzią na farmakoterapię L-dopą u chorych z chorobą Parkinsona

Chorzy z chorobą Parkinsona				
Oznaczona mutacja/polimorfizm	Czas trwania choroby			Poziom istotności (p)
	poniżej 5 lat	od 5 do 10 lat	powyżej 10 lat	
<b>c.500 G&gt;A PRKN</b>	-	-	<b>R +0,554</b>	<b>0,017</b>
<b>c.930 G&gt;C PRKN</b>	-	-	*	<b>0,05</b>
<b>c.1180 G&gt;A PRKN</b>	<b>R+0,385</b>	-	-	<b>0,047</b>

\* wynik bliski istotności statystycznej

R- współczynnik korelacji Spearmana podany dla  $p < 0,05$ .

U chorych z chP uwzględniono również występowanie objawów neuro-psychiatrycznych (objawy depresji i stopień otępienia). Objawy depresji stwierdzono u 14% przebadanych osób, większość z nich, 69% stanowili chorzy z mutacjami punktowymi (korelacja Spearmana dla genu *SPR*,  $R=+0,371$ ;  $p<0,001$ ), w tym 46% w genie *PRKN* (6 chorych), 15% w genie *SPR* (2 chorych), oraz 8% w genach *SPR* i *PRKN* jednocześnie (1 chory). W grupie chorych z chP wykazano również u osób bez mutacji w analizowanych genach otępienie stopnia łagodnego (u 6%) oraz zarówno u chorych z mutacjami, jak i bez oznaczonych mutacji MCI (u 9%). U chorych z MCI z mutacjami punktowymi, przewagą stanowiły mutacje w genie *PRKN* w porównaniu do mutacji w *SPR* i *PRKN* jednocześnie.

## 5. Dyskusja

Przyczyny chP upatruje się zarówno w czynnikach środowiskowych, jak i genetycznych. Uważa się, że czynniki środowiskowe, takie jak: MPTP, jony metali m.in. ołowiu, manganu i żelaza, pestycydy i rozpuszczalniki organiczne oraz niektóre leki [1,169] mogą wpływać na wystąpienie objawów parkinsonizmu. Zdaniem wielu autorów substancje toksyczne zawarte w środowisku wywołują objawy parkinsonizmu jedynie u osób z predyspozycjami genetycznymi do zachorowania na chP. Jednocześnie uważa się, że czynniki genetyczne zasadniczo warunkują występowanie RchP [75,83,129,145,164].

Wykazano, że ok. 5-10% przypadków chorych z chP stanowią osoby z RchP, uwarunkowaną monogenowo i dziedziczną klasycznie recesywnie lub dominująco, różniącą się od SchP zasadniczo wiekiem zachorowania [1,169]. Chorzy z RchP, w większości chorują wcześniej w porównaniu do osób ze SchP. Obecnie uważa się, że mechanizmy molekularne odpowiedzialne za wystąpienie RchP, odgrywają również ważną rolę w patogenezie SchP.

Przyjmuje się, że ujawnienie się SchP następuje wskutek wpływu różnych czynników, w tym genetycznych na procesy zachodzące w komórce, m.in. transdukcję sygnału, transport pęcherzykowy, proces autofagii oraz funkcje mitochondrialne [169]. Sugeruje się także, że kliniczna heterogenność chP, w tym SchP może wiązać się z interakcjami nie tylko genetyczno-środowiskowymi, ale również z wzajemnymi oddziaływaniami między genami, takimi jak: *SNCA*, *PRKN*, *LRRK2*, *PINK1* oraz ich produktami białkowymi: ASN, parkina, LRRK2, PINK1, odpowiednio [64,100,110,128,143,165,168].

Szczególnie istotny dla patogenezy chP jest produkt genu *SNCA*, białko ASN. Jego zaburzona struktura oraz podwyższona ekspresja powstaje najprawdopodobniej zarówno w wyniku mutacji punktowych, multiplikacji całego genu, jak i polimorfizmu promotora genu *SNCA*. Spośród trzech do tej pory opisanych mutacji punktowych genu *SNCA*, jedynie mutacja c.88 G>C występująca w populacji niemieckiej, o charakterze RchP z obrazem choroby bardzo podobnym do przebiegu SchP wskazywała na prawdopodobieństwo jej wystąpienia w populacji polskiej [69,70]. Zatem uzasadnionym wydawało się włączenie analizy tej mutacji do niniejszych badań. W wyniku przeprowadzonej analizy genetycznej nie wykazano jednak obecności mutacji c.88 G>C genu *SNCA* u żadnej z 241 przebadanych osób, w tym 90 chorych z chP z ujemnym wywiadem rodzinnym.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły jednocześnie sądzić, że w populacji polskiej najprawdopodobniej ta mutacja nie występuje oraz wskazywały na homogenność grupy badanej (wykluczenie przypadków RchP).

Z pracy Chiba-Falek i wsp. wynika, że w patogenezę SchP w odróżnieniu od mutacji punktowych i multiplikacji genu *SNCA* jest zaangażowany polimorfizm w odcinku promotorowym tego genu obejmujący 5 najczęściej występujących alleli (-1, 0, +1, +2, +3) [82]. Z doniesień piśmiennictwa wynika także, że w chP rozkład genetyczny alleli regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA* jest zróżnicowany w poszczególnych populacjach. Genotyp +1/+1 regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA*, w populacjach: Włoch, Japonii i Singapuru [83-85,87-89] występował z podobną częstością zarówno u osób zdrowych, jak i chorych z chP.

Natomiast zarówno w populacji europejskiej, w tym również polskiej (polimorfizm oznaczony po raz pierwszy w przeprowadzonych badaniach), jak i australijskiej oraz amerykańskiej genotyp +1/+1 występował częściej u osób kontrolnych, niż u chorych z chP. Ponadto z doniesień piśmiennictwa i przeprowadzonych badań wynika, że genotyp ten istotnie zmniejszał ryzyko wystąpienia chP, a także wpływał na łagodniejszy przebieg tej choroby zwyrodnieniowej, najprawdopodobniej przez obniżenie ekspresji ASN [82,165,168]. Uważa się, że obniżony poziom ASN u chorych z chP warunkowany obecnością tego genotypu może spowalniać postęp choroby, najprawdopodobniej przez zmniejszoną jej agregację i utrzymywanie homeostazy DA (przez regulację ekspresji HT i aktywności DA) w OUN [182,183]. Ponadto, wykazano, że obecność genotypu +1/+1 u chorych z chP w populacji polskiej wiązała się z lepszą odpowiedzią na farmakoterapię L-dopą i stosowaniem u chorych niższych dawek tego leku (ok. 500 mg/dobę).

Z niniejszej pracy wynika także, że genotyp +1/+1 regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA* występujący z mniejszą częstością u chorych z chP w porównaniu z osobami kontrolnymi posiadał również mniejszą częstość występowania u chorych z MSA niż u osób kontrolnych, najprawdopodobniej ze względu na podobieństwo lokalizacji uszkodzeń w OUN w obydwu analizowanych chorobach układu pozapiramidowego. Jednocześnie wykazana w przeprowadzonych badaniach, mniejsza częstość występowania genotypu +1/+1 u chorych z rozpoznanym zespołem parkinsonowskim w przebiegu choroby zwyrodnieniowej w porównaniu z osobami kontrolnymi, może wskazywać na prawidłowe wstępne rozpoznanie zaburzeń w układzie pozapiramidowym [188].

Wykazano, że częstość występowania pozostałych oznaczonych alleli regionu NACP-Rep1 genu *SNCA* i ich wpływ na rozwój chP są bardziej zróżnicowane niż allelu +1 [86-89]. Badania na populacjach: niemieckiej, włoskiej, japońskiej, jak i badania wielopopulacyjne, wskazują na zwiększone ryzyko wystąpienia chP w przypadku obecności alleli +2, +3, a nawet 0 [85,87,184]. W niniejszej pracy potwierdzono istotnie większą częstość występowania alleli +2 i +3 u chorych z chP oraz wzrost ryzyka zachorowania na chP w przypadku ich obecności. Uważa się, że wpływ obecności genotypów +2/+2 i +2/+3 na ryzyko ujawnienia się chP najprawdopodobniej może wiązać się z warunkowanym przez te warianty podwyższonym poziomem ekspresji ASN, prowadzącym do zwiększonej agregacji ASN i nasilenia jej efektu neurotoksycznego [65,82,83,186,187]. Uważa się także, że w chP w proces agregacji ASN zaangażowana jest DA, której poziom ulega obniżeniu w przebiegu tej choroby zwyrodnieniowej. Wykazano, że u chorych z chP przed pojawieniem się objawów klinicznych, kiedy jeszcze nie dochodzi do obniżenia poziomu DA, proces agregacji ASN może ulegać nasileniu. Udział DA w nasileniu agregacji ASN może również potwierdzać ograniczenie występowania procesu zwyrodnieniowego w OUN w chP do obszarów obejmujących istotę czarną śródmózgowia [101].

Ponadto w przeprowadzonych badaniach wykazano, że obecność genotypów +2/+2 i +2/+3 u chorych z chP wiązała się z szybszym postępem choroby, a w przypadku genotypu +2/+3 również z gorszą odpowiedzią na terapię L-dopą. Z pracy Ritz i wsp. [189] wynika, że u chorych z chP z allelem +3 regionu NACP-Rep1 promotora genu *SNCA* czterokrotnie wzrasta ryzyko wystąpienia szybko postępującego zaburzenia funkcji ruchowych, często połączonych z gorszą odpowiedzią na leczenie L-dopą. Ponadto, badania Kay i wsp. [185] wskazują, że obecność alleli +2, a szczególnie +3 najprawdopodobniej wpływa również na obniżenie wieku zachorowania na chP [190]. Natomiast, w niniejszej pracy nie obserwowano takiej zależności.

W niniejszej pracy, podobnie jak w badaniach de Marco i wsp. [191], u chorych z chP nie wykazano związku między obecnością poszczególnych genotypów regionu NACP-Rep1, a występowaniem MCI lub otępienia (w skali MMSE).

W odróżnieniu od wyników opublikowanych przez Kay i wsp. [185] w niniejszej pracy nie wykazano związku między występowaniem allelu 0, a ryzykiem zachorowania na chP. W pracy Maraganore obejmującej metaanalizę 11 populacji chorych z chP wskazuje się na brak związku allelu +2 w przeciwieństwie do allelu +3 ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na tę chorobę [86]. Jednocześnie



prace prowadzone u chorych z chP na populacjach Singapuru i Włoch podważają jakikolwiek związek alleli regionu NACP-Rep1 genu *SNCA*, warunkującego poziom ASN z tą chorobą [85,88].

Wiadomo, że na poziom ASN w komórce może wpływać nieefektywna eliminacja tego białka przez układ ubikwityna-proteasom [192], w którym białko parkina kodowane przez gen *PRKN*, odgrywa ważną rolę. W piśmiennictwie ukazało się wiele doniesień wskazujących na udział mutacji punktowych (najczęściej w eksonach 2, 4, 7, 8, 10, 11) oraz delecji i duplikacji poszczególnych eksonów (najczęściej 2, 3, 4) genu *PRKN* w patogenezie zarówno RchP, jak i SchP, a w szczególności we WchP. Jednakże uzyskiwane wyniki badań mutacji i polimorfizmów genu *PRKN* w poszczególnych analizowanych populacjach były rozbieżne [78,165,168,174,175].

Wiele doniesień wskazywało na istotną rolę w patogenezie SchP delecji eksonów 2 i 4 genu *PRKN* [193-195]. Jednakże w przebadanej grupie osób w niniejszej pracy, podobnie jak w populacji amerykańskiej i brazylijskiej [171,201] nie wykazano obecności delecji eksonów 2 i 4. Nie można jednak wykluczyć u chorych z chP w populacji polskiej udziału innych, rzadziej opisywanych delecji eksonów genu *PRKN* (z wyjątkiem homozygotycznych delecji eksonów 7, 8 i 11). Praca wymaga jednak dalszych badań na obecność delecji pozostałych fragmentów genu *PRKN*.

W piśmiennictwie opisano również udział w patogenezie chP mutacji punktowych w obrębie genu *PRKN*. Wiadomo, że mutacje te w konfiguracji homozygotycznej są przyczyną występowania dziedzicznej autosomalnie recesywnie RchP. Natomiast jest niejednoznaczny udział heterozygotycznych mutacji tego genu w ujawnieniu się lub zwiększeniu ryzyka wystąpienia chP, w tym SchP [105,196]. Część prac wskazuje, że mutacje heterozygotyczne genu *PRKN* nie wykazują związku z występowaniem SchP [194,166], jednak w populacji Europy, w tym Polski, Ameryki oraz w badaniach wielopopulacyjnych wykazano istotny związek mutacji *PRKN* z występowaniem SchP [105,197]. Wydaje się, że wykazana w doniesieniach piśmiennictwa różna częstość występowania mutacji genu *PRKN* najprawdopodobniej wynikała z ich zróżnicowanego rozkładu genetycznego w poszczególnych analizowanych populacjach.

W niniejszej pracy oznaczono pięć substytucji genu *PRKN* (c.500 G>A, c.520 C>T, c.823 C>T, c.930 G>C, c.1180 G>A) z czego po raz pierwszy w populacji polskiej oznaczono substytucje: **c.823 C>T**, **c.930 G>C** *PRKN*,

a także po raz pierwszy na świecie mutację **c.520 C>T PRKN**. Z pracy Koziorowskiego i wsp. [175] wynika, że w populacji polskiej mogą również występować polimorfizmy: c.500 G>A, potwierdzony w niniejszej pracy oraz c.1138 C>T, c.11854 C>T PRKN.

Z przeprowadzonych badań wynika także, że u chorych z chP (w wieku zasadniczo po 40 r.ż.) częstość występowania wszystkich oznaczonych substytucji genu PRKN w populacji polskiej wzrastała prawie czterokrotnie i wynosi 30% chorych z chP w porównaniu do osób kontrolnych (8%) [210]. Wyników tych nie potwierdzono w badaniach Koziorowskiego i wsp. we WchP, najprawdopodobniej ze względu na wiek osób kontrolnych poniżej 40 r.ż., u których w przypadku nosicielstwa mutacji PRKN wystąpienie chP w przyszłości mogło być prawdopodobne. W niniejszej pracy wykazano również, że obecność substytucji genu PRKN prowadzi do ponad sześciokrotnego wzrostu ryzyka ujawnienia się chP. Jednocześnie wykazano, że w przebadanej w niniejszej pracy grupie osób najczęściej występują trzy polimorfizmy: c.500 G>A, c.930 G>C oraz c.1180 G>A genu PRKN, wpływającego na strukturę białka parkiny.

Pierwszy z nich, tranzycja c.500 G>A zlokalizowana jest w regionie domeny UPD charakterystycznej dla parkiny. W piśmiennictwie wskazywano zarówno na brak związku tego polimorfizmu z patogenezą chP [198], jak i jego wpływ na podwyższone ryzyko zachorowania na chP [165,168,194]. Z przeprowadzonych badań wynika, że w populacji polskiej u chorych z chP, substytucja c.500 G>A PRKN zwiększała ryzyko ujawnienia się choroby, podobnie jak druga z oznaczonych substytucji w tej grupie chorych, tranzycja c.1180 G>A zlokalizowana pomiędzy domenami IBR i RING2. Jak wykazano tranzycja c.1180 G>A występowała z różną częstością m.in. w populacjach: Europy (z podobną częstością w przebadanej populacji polskiej), Ameryki i Meksyku i nie wykazano jej obecności w populacji Japonii [167,169,173,198,199].

Natomiast zlokalizowana pomiędzy domenami RING1 i IBR, trans wersja c.930 G>C PRKN opisana po raz pierwszy u dwojga rodzeństwa z RPA, u jednego z nich ujawniła się jako WchP, a u drugiego, w wieku 51 lat nie dawała objawów klinicznych chP [200]. Jej występowanie potwierdzono w populacji Ameryki Północnej jedynie u chorych ze SchP oraz nie wykazano jej obecności u osób kontrolnych [194]. Natomiast w populacji polskiej (badania własne) substytucja c.930 G>C PRKN występowała trzykrotnie częściej u chorych z chP z ujemnym wywiadem rodzinnym i pojawiała się u chorych z chP w wieku od 41 (czas trwania choroby krótszy niż 5 lat) do 76 lat (czas trwania choroby nie dłuższy niż 10 lat) i u osób

kontrolnych. U badanych osób mutacja ta niemal czterokrotnie zwiększała ryzyko zachorowania na chP. Z przeprowadzonych badań oraz z pracy Bardien i wsp. [200] wynika, że oznaczona substytucja może wykazywać niepełną penetrację lub prowadzić do zmian w OUN przed pojawieniem się objawów klinicznych oraz zwiększać ryzyko PchP prawdopodobnie w połączeniu z innymi czynnikami genetycznymi lub środowiskowymi.

Pozostałe dwie oznaczone w niniejszej pracy mutacje genu *PRKN* (c.823 C>T, c.520 C>T) występowały jedynie u chorych z chP. W przeprowadzonych badaniach podobnie jak w populacji amerykańskiej, mutację c.823 C>T wykazano tylko u jednego chorego z chP [201]. Zdaniem Sinha i wsp. mutacja ta jest charakterystyczna dla chP i cechuje się wysoką penetracją [201], najprawdopodobniej ze względu na swoją lokalizację w obrębie regionu kodującego domenę RING1. Jak wykazano, mutacje zmiany sensu w obrębie domeny RING mogą wpływać na aktywność parkiny oraz jej agregację i nasilać proces neurotoksyczny [202].

Kolejną wykrytą mutacją genu *PRKN* powodującą zamianę aminokwasów w białku parkina była substytucja c.520 C>T w kodonie 174. Do tej pory w kodonie 174 opisywano jedynie mutację cichą c.522 C>T nie posiadającą patogennego charakteru [203]. Natomiast oznaczona w niniejszej pracy mutacja **c.520 C>T *PRKN***, nie opisywana do tej pory w piśmiennictwie, o charakterze zmiany sensu w obrębie tego samego kodonu genu *PRKN* występowała jedynie u dwóch badanych chorych z chP. Jednocześnie wykazano, że wykryta mutacja c. 520 C>T prowadziła u obydwu chorych z chP do stosunkowo wczesnego ujawnienia się choroby, przed 40 r.ż. (w wywiadzie). Wydaje się, że oznaczona w niniejszej pracy mutacja c.520 C>T umiejscowiona w obrębie domeny UPD, ze względu na swoją lokalizację prawdopodobnie nie wpływa na aktywność parkiny i w innym mechanizmie może zwiększać ryzyko wystąpienia chP. Hipoteza ta wymaga jednak dalszych badań.

Obecnie przyjmuje się, że jednoznacznie za ujawnienie się chP są odpowiedzialne mutacje homozygotyczne genu *PRKN*. W piśmiennictwie pojawiły się prace sugerujące, że obecność więcej niż jednej mutacji heterozygotycznej genu *PRKN* może również prowadzić do ujawnienia się chP [199]. W niniejszych badaniach wykazano, że u 5% chorych z chP obecność wielokrotnych mutacji heterozygotycznych genu *PRKN* (dwukrotnych, trzykrotnych) mogła być związana z ujawnieniem się choroby.

Wydaje się również, że ujawnienie się chP, u osób z pojedynczą mutacją heterozygotyczną (25% chorych z PchP w niniejszej pracy) może wynikać z obecności dodatkowych nieoznaczonych mutacji w innym regionie tego genu, chociaż niewykluczone jest, że pojedyncze mutacje heterozygotyczne *PRKN* mogą być

wystarczające, do zwiększenia ryzyka zachorowania na chP wskutek wywoływania uszkodzeń w układzie czarno-prążkowiowym. Z pracy Khan i wsp. wynika, że u bezobjawowych heterozygot *PRKN*, mogą występować zaburzenia w obrębie szlaku czarno-prążkowiowym i prowadzić do ujawnienia się PchP [204]. W badaniach przeprowadzonych u osób z heterozygotyczną mutacją *PRKN* z wykorzystaniem metody PET, stwierdzono istotne zmniejszenie wychwytu F-18-dopy w tym obszarze OUN w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast wykazana w niniejszej pracy obecność mutacji heterozygotycznych w genie *PRKN* u osób kontrolnych może wskazywać na prawdopodobieństwo ujawnienia się choroby u tych osób w późniejszym wieku lub na jej nosicielstwo.

W niniejszej pracy u chorych z chP z oznaczonymi mutacjami w genie *PRKN*, a szczególnie z substytucją c. 930 G>C *PRKN*, obserwowano wolniejszy postęp choroby w porównaniu z chorymi bez wykazanej w tym genie mutacji. Z przeprowadzonych badań wynika także, że mutacje punktowe genu *PRKN* najprawdopodobniej wpływały na opóźnienie postępu chP, z różnym nasileniem w zależności od ich położenia (szczególnie spowalniały eksony 8 a następnie 4). U czterech osób spośród 27 chorych z chP z mutacjami w genie *PRKN*, u których choroba trwała powyżej 10 lat, obserwowano początkowe stadium zaawansowania choroby (1 lub 2 stopień w skali H-Y) związane najprawdopodobniej z obecnością przynajmniej jednej mutacji w eksonie 8 i/lub 4 tego genu.

Ponadto wykazano, że u badanych w niniejszej pracy chorych z chP oznaczone mutacje w genie *PRKN* w zróżnicowany sposób warunkowały odpowiedź na terapię L-dopą. Jak wykazano, substytucja c.1180 G>A *PRKN* dawała dobrą odpowiedź na farmakoterapię L-dopą już na początku trwania choroby (poniżej 5 lat stosowania), natomiast substytucje c.500 G>A *PRKN* i c.930 G>C *PRKN* podczas długotrwałej terapii (powyżej 10 lat leczenia) tym preparatem. Obserwacje te są zasadniczo zgodne z dotychczasowymi doniesieniami piśmiennictwa, chociaż w piśmiennictwie wskazuje się również, że chorzy z mutacją *PRKN* są bardziej narażeni na wczesne występowanie powikłań ruchowych [105,199,205]. Ponadto, zarówno w populacji amerykańskiej, jak i u chorych z chP badanych w niniejszej pracy, nie wykazano związku między obecnością mutacji w genie *PRKN*, a występowaniem MCI lub otępienia (w skali MMSE) [206].

Z doniesień piśmiennictwa wynika, że mutacje i polimorfizmy genu *PRKN* [207,208] prawdopodobnie mogą wpływać na ujawnienie się chP przez obniżenie ekspresji białka parkiny, odpowiedzialnego za prawidłową degradację ASN [205,209]. Z prac Dorszewskiej i wsp. oraz Białek i wsp. wynika, że w chP wraz z jej postępem

dochodzi do obniżenia poziomu osoczowej parkiny i ASN. Jednocześnie wykazano, że u chorych z chP z mutacjami w genie *PRKN* dochodzi do obniżenia stężenia krążącej ASN, najprawdopodobniej przez jej zwiększone odkładanie się w OUN [83,187,205].

Ponadto, wskazuje się, że w chP nadekspresja ASN będąca najprawdopodobniej skutkiem polimorfizmów genu *SNCA* lub ich współistnienia z innymi mutacjami m.in. w genie *PRKN* może prowadzić do zwiększonej agregacji tego białka i ujawnienia się chP [187]. Jak wynika z przeprowadzonych badań współistnienie wariantów +2/+2 i +2/+3 promotora genu *SNCA* z mutacjami w genie *PRKN* może odpowiadać za ujawnienie się chP. Natomiast współistnienie wariantów promotora genu *SNCA* +1/0, +1/+1, +1/+2 wraz z mutacjami w genie *PRKN*, najprawdopodobniej przez zmiany poziomu lub struktury parkiny może się wiązać zarówno z ujawnieniem choroby, jak i z jej nosicielstwem.

Wiadomo również, że nieprawidłowości w budowie parkiny mogą nie tylko zaburzać systemem ubikwityna-proteasom, ale również wpływać na prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów m.in. z udziałem białka *LRRK2* oraz regulację stresu oksydacyjnego z udziałem m.in. białka *HTRA2*.

W piśmiennictwie pojawiły się liczne doniesienia wskazujące na istotny związek mutacji i polimorfizmów genu *LRRK2* szczególnie w eksonie 41 z podwyższonym ryzykiem wystąpienia chP [131-134,138]. Jednakże w przeprowadzonych badaniach nie wykazano obecności mutacji/polimorfizmów w eksonie 41 genu *LRRK2* u żadnej z 241 badanych osób. Uzyskane wyniki badań są zarazem zgodne z badaniami prowadzonymi wcześniej w populacji Polski przez Białecką i wsp. na grupie liczącej ok. 300 osób [140] i pozwalają przypuszczać, że mutacje w eksonie 41 genu *LRRK2* nie są istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia chP dla naszej populacji.

W odróżnieniu od genu *LRRK2*, doniesienia dotyczące zaangażowania genu *HTRA2* w patogenezę chP są nieliczne, a mutacje w tym genie są mało zbadane [145,146,148,151]. W pracy Sancheza i Singleton [146] w populacji Ameryki Północnej opisano dwie mutacje c.1195 G>A i c.421 G> T występujące z podobną częstością u chorych z chP i osób kontrolnych.

W niniejszej pracy wykazano obecność, opisanych w populacji amerykańskiej mutacji c.1195 G>A i c.421 G>T genu *HTRA*, do tej pory nie opisywanych w populacji polskiej występujących jedynie u chorych z chP. Jednocześnie wykazano, że w populacji polskiej mutacja c.1195 G>A (pojedyncza lub w połączeniu z mutacją *PRKN*) wiązała się z późnym początkiem ujawnienia się choroby.

W niniejszej pracy pojawiła się u dwóch chorych z chP, w wieku 67 i 69 lat chorujących krócej niż 5 lat. Natomiast substytucja c.421 G>T genu *HTRA* (w połączeniu z mutacją *PRKN*) wiązała się z wcześniejszym ujawnieniem się chP. W przeprowadzonych badaniach wykazano ją u chorego z chP w wieku 51 lat, chorującego od ponad 10 lat. Ponadto w niniejszej pracy u chorych z chP z mutacją *HTRA2* obserwowano wolniejszy postęp choroby (1 stopniu zaawansowania choroby w skali H-Y) a chorzy charakteryzowali się dobrą odpowiedzią na terapię L-dopą, niezależnie od rodzaju oznaczonej substytucji.

W pracy Strauss i wsp. w populacji niemieckiej oraz w populacji polskiej wykazano, że mutacje c.1195 G>A i c.421 G>T genu *HTRA2* pojawiały się z podobną częstością [145]. Wydaje się zatem, że oznaczone mutacje w genie *HTRA2*, modyfikujące strukturę białka *HTRA2* mogą być jednym z czynników ryzyka rozwoju chP zwłaszcza, że w pracy Strauss i wsp. wykazano występowanie zaburzeń węchu u bezobjawowego nosiciela mutacji *HTRA2* [145].

Uważa się, że oprócz białek ASN, parkina i *HTRA2* w patogenezę chP może być zaangażowane również białko SR kodowane przez gen *SPR*.

W piśmiennictwie pojawiły się doniesienia wskazujące, że gen *SPR* jest jednym z możliwych genów kandydackich do locus *PARK3* [124]. Jednak w badaniach asocjacyjnych West i wsp. nie wykazano związku tego genu z locus *PARK3* [119]. Natomiast w pracy Tobin i wsp. [123], w mózgu chorych z chP wykazano zwiększoną ekspresję *SPR* na poziomie mRNA najprawdopodobniej związaną z ujawnieniem się chP. Ponadto wykazano, że niektóre markery mikrosatelitarne w obrębie genu *SPR* były związane z wiekiem zachorowania na chP [121,122].

Jak do tej pory mutacje w genie *SPR* wykazano w dystonii związanej z niedoborem SR i w zaburzeniach psychiatrycznych (m.in. choroba afektywna dwubiegunowa), ale nie badano ich w chP [112,123]. Wydawało się, że w chP najbardziej prawdopodobnym miejscem dla wystąpienia mutacji w tym genie mógł być kodon 213, ze względu na występującą w tym miejscu fosforylację S213, związaną z regulacją aktywności białka SR zaangażowanego w biosyntezę DA [130].

W przeprowadzonych badaniach w kodonie 213 wykazano u chorych z chP obecność nie opisywanej do tej pory w piśmiennictwie mutacji **c.637 T>A genu *SPR***, z dwukrotnie większą częstością niż w grupie kontrolnej. Jednocześnie wydawało się prawdopodobne, że mutacja c.637 T>A uwzględniając jej lokalizację w genie *SPR*, może wpływać na fosforylację SR i w różnym stopniu regulować biosyntezę DA

i 5-HT. Hipoteza ta wymaga dalszych badań w kierunku oznaczenia ekspresji genu i przeprowadzenia testów funkcjonalnych białka SR.

Ponadto, wykazano, że u badanych chorych z chP, mutacja c.637 T>A *SPR* nie wpływała zarówno na postęp choroby i odpowiedź na leczenie L-dopą, jak i na wystąpienie u chorych zaburzeń funkcji poznawczych czy otępienia. Natomiast u badanych chorych wykazano, że mutacja ta istotnie wpływała na występowaniem objawów depresji, które klinicznie rozpoznano u trzech spośród czterech badanych chorych z chP z mutacją w genie *SPR* (z pojedynczą lub podwójną w połączeniu z genem *PRKN*). Wydaje się zatem prawdopodobne, że zmutowana forma produktu białkowego genu *SPR*, mogła wpływać na zmianę poziomu 5-HT. Wiadomo, że poziom 5-HT ulega obniżeniu w przebiegu m.in. depresji, prawdopodobnie przez zaburzenie procesu transkrypcji wywołane obecnością polimorfizmów genu *SPR* [112,123].

Wydaje się, że coraz częściej pojawiająca się w piśmiennictwie jednoczesna analiza genów PARK (w tym będących przedmiotem niniejszego opracowania: *PRKN*, *SNCA*) na obecność mutacji punktowych, delecji i polimorfizmów może mieć w przyszłości istotne znaczenie dla diagnostyki różnicowej chP i innych chorób przebiegających z zaburzeniami w układzie pozapiramidowym. Przeprowadzone badania wskazują, że polimorfizm promotora genu *SNCA* wydaje się warunkować podatność na występowanie zaburzeń układu pozapiramidowego towarzyszących nie tylko chP, natomiast mutacje punktowe w pozostałych analizowanych genach PARK (*PRKN*, *SPR* i *HTRA2*) najprawdopodobniej wiążą się wyłącznie z patogenezą chP przez ich wpływ na ryzyko wystąpienia, czas ujawnienia się, przebieg oraz pojawienie się objawów neuropsychiatrycznych u tych chorych.

Jednocześnie wydaje się, że uzyskane wyniki badań mogą w przyszłości stać się podstawą do opracowania metody diagnostycznej pozwalającej na rozpoznanie chP na długo przed pojawieniem się charakterystycznych objawów klinicznych, a tym samym umożliwić wcześniejsze i skuteczniejsze leczenie chorych. Ponadto, wykazane w niniejszej pracy u badanych osób zmiany na poziomie genomu mogą wnieść ważne informacje do patogenezы chP zarówno w populacji polskiej, jak i w populacjach o podobnym rozkładzie genetycznym.

Jak do tej pory, w Polsce chP nie znalazła wśród chorób neurologicznych, dla których wyznaczono geny istotne dla diagnostyki. Wydaje się, że w przyszłości warto byłoby rozważyć włączenie analizy mutacji i polimorfizmów genów PARK do diagnostyki chP w populacji polskiej.

## 6. Wnioski

1. W populacji polskiej występują pojedyncze, dwukrotne i trzykrotne mutacje i/lub polimorfizmy w genach zarówno o uznanej roli w patogenezie choroby Parkinsona: *PRKN* (c.500 G>A, c.520 C>T, c.823 C>T, c.930 G>C, c.1180 G>A ), jak i w genach kandydackich: *SPR* (c.637 T>A) i *HTRA2* (c.421 G>T, c.1195 G>A).
2. Mutacje punktowe w genie *PRKN* (c.823 C>T, c.930 G>C, c.1180 G>A) w przypadku współistnienia genotypów +2/+2 lub +2/+3 genu *SNCA* wydają się zwiększać ryzyko ujawnienia choroby Parkinsona a w obecności genotypu +1/+1 *SNCA* osłabiać jego ochronne działanie.
3. Nieopisane do tej pory w piśmiennictwie mutacje **c.520 C>T** *PRKN* i **c.637 T>A** *SPR* wydają się być włączone w patogenezę choroby Parkinsona w populacji polskiej.
4. W chorobie Parkinsona polimorfizm promotora *SNCA* jest prawdopodobnie związany jedynie z podatnością na zachorowanie, natomiast mutacje genach *PRKN*, *HTRA2*, *SPR* wydają się wpływać na ujawnienie się i przebieg tej choroby.
5. W populacji polskiej najprawdopodobniej nie występują mutacje eksonu 41 genu *LRRK2*.
6. Wydaje się, że jednoczesna analiza genów *PRKN*, *HTRA2*, *SPR* i regionu promotorowego genu *SNCA* może stanowić dodatkowy czynnik diagnostyczny i prognostyczny w chorobie Parkinsona.



## 7. Streszczenie

Wydłużenie średniej długości życia przyczyniło się do zwiększonej liczby zachorowań na schorzenia typowe dla wieku starczego, w tym na chorobę Parkinsona (chP). Uważa się, że na ujawnienie się chP wpływają zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe. Do genów związanych z chP, zarówno z rodzinną, jak i sporadyczną zalicza się geny z rodziny PARK. Niektóre z nich, takie jak: *SNCA* i *PRKN* zostały dość dobrze poznane, o innych m.in. *SPR* czy *HTRA2* wiadomo wciąż niewiele. Szczególnie mało jest doniesień obejmujących jednoczesną analizę genów PARK, których produkty białkowe, takie jak: ASN, parkina, LRRK2, HTRA2, SR mogą przyczyniać do rozwoju patologicznych zmian w mózgu chorych z chP.

Celem pracy była jednoczesna analiza mutacji genów: *SNCA*, *PRKN*, *LRRK2*, *HTRA2* i *SPR* oraz ocena częstości ich występowania u chorych z chP, zanikiem wieloukładowym (ang. multiple system atrophy, MSA), z zespołem parkinsonowskim w przebiegu choroby zwyrodnieniowej oraz u kontrolnych ochotników w populacji polskiej. U chorych z chP podjęto również próbę korelacji pomiędzy oznaczonymi mutacjami w badanych genach PARK, a postępem choroby i wybranymi objawami neuropsychiatrycznymi, a także odpowiedzią na stosowaną farmakoterapię L-dopą.

Badaniu poddano 90 chorych z chP (w wieku 34-82 lat), 3 chorych z MSA (w wieku 53-63 lat), 35 chorych z zespołem parkinsonowskim w przebiegu choroby zwyrodnieniowej (w wieku 38-86 lat) oraz 113 kontrolnych ochotników (w wieku 39-83 lat). DNA izolowano z komórek krwi obwodowej pobranej od badanych osób według standardowej procedury. Analizę genetyczną przeprowadzono z zastosowaniem metod: PCR, HRM, RFLP, elektroforezy kapilarnej i sekwencjonowania. Uzyskane wyniki badań poddano ocenie statystycznej.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że u chorych z chP genotyp +2/+2 lub +2/+3 regionu NACP-REP1 *SNCA* zwiększał ryzyko wystąpienia choroby, nasilone współistnienie mutacji w genie *PRKN*, natomiast genotyp +1/+1 wykazywał rolę ochronną, osłabioną obecnością mutacji w genie *PRKN*. Ponadto, genotyp +1/+1 posiadał mniejszą częstość występowania u wszystkich chorych z zaburzeniami w układzie pozapiramidowym, u chorych z chP ( $p < 0,001$ ), MSA, jak i z rozpoznanym zespołem parkinsonowskim ( $p < 0,001$ ) w porównaniu z kontrolą. Ponadto, wykazano, że mutacje punktowe i polimorfizmy *PRKN* w badanej populacji występowały częściej u chorych z chP w porównaniu z grupą kontrolną ( $p < 0,001$ ) i zwiększały ryzyko ujawnienia się choroby. Jednocześnie oznaczone substytucje

w genie *PRKN* (szczególnie c.500 G>A, c.930 G>C i c.1180 G>A) wiązały się z wolniejszym postępem choroby i lepszą odpowiedzią na farmakoterapię L-dopą. U żadnej z badanych osób nie wykazano obecności mutacji w eksonie 41 w genu *LRRK2*. Natomiast po raz pierwszy w populacji polskiej u chorych z chP wykazano obecność mutacji punktowych c.421 G>T oraz c.1195 G>A genu *HTRA2*, wskazując na udział tego genu w modulacji ryzyka chP. Ponadto opisano dwie nowe mutacje **c.520 C>T** *PRKN* związanej prawdopodobnie ze zwiększeniem ryzyka zachorowania na chP oraz obniżeniem wieku ujawnienia się choroby oraz **c.637 T>A** w kodonie 213 genu z *SPR*, zwiększającej ryzyko wystąpienia chP i pojawienie się u chorych z chP objawów depresji ( $p<0,001$ ).

Wydaje się, że jednoczesna analiza genów *PRKN*, *SPR*, *HTRA2* oraz *SNCA* może mieć znaczenie dla usprawnienia procesów diagnostycznych i prognostycznych zaburzeń układu pozapiramidowego oraz może się przyczynić do wprowadzenia skuteczniejszej farmakoterapii.

---

## 8. Abstract

Extending the life expectancy contributed to the increased number of cases of diseases typical for old age, including Parkinson's disease (PD), which is one of the most common degenerative diseases of the central nervous system (CNS). It is believed that in pathogenesis of PD are involved genetic and environmental factors. It is known that several genes may modulate risk of PD. *Some* of them, such as *SNCA* and *PRKN* are fairly well understood, the other including *SPR* and *HTRA2* are still little known. Moreover there are only few reports involving the simultaneous analysis of PARK genes whose protein products, such as ASN, Parkin, LRRK2, HTRA2, SR may contribute to the development of pathological changes in the brain of patients with PD

The aim of the study was the simultaneous analysis of mutations in *SNCA*, *PRKN*, *LRRK2*, *HTRA2* and *SPR* genes and estimate their frequency in patients with PD, multisystem atrophy (multiple system atrophy called, MSA), with a parkinsonian syndrome in degenerative disease and in control subjects in the Polish population. In patients with PD, it was also analysed correlation between detected mutations of PARK genes and the progression of the disease, neuropsychiatric symptoms (degree of dementia, clinically recognized symptoms of depression), and response to pharmacotherapy used L-dopa.

The study involved 90 patients with PD (age 34-82 years), 3 patients with MSA (age 53-63 years), 35 patients with parkinsonian syndrome in osteoarthritis (age 38-86 years) and 113 control subjects (age 39-83 years). DNA was extracted from peripheral blood cells taken from the subjects according to a standard procedure. Genetic analysis was performed using methods: PCR, HRM, RFLP, capillary electrophoresis and sequencing. The results were evaluated statistically.

In present study it have been shown that PD patients with genotype +2/+2 or +2/+3 of the region NACP-Rep1 of *SNCA* increased risk of illness, severe coexisting mutations *PRKN*, while genotype +1/+1 showed a protective role, weakened by the presence of mutations in the *PRKN* gene. In addition, genotype +1/+1 had a lower incidence of all patients with extrapyramidal system disorders in patients with PD ( $P < 0.0001$ ), MSA, and diagnosed as parkinsonian syndrome ( $p < 0.001$ ) compared to the control. It have been also shown that point mutations and polymorphisms of *PRKN* in the study population occurred more frequently in PD patients compared with the control group ( $p < 0.0001$ ) and increased the risk of onset. Moreover, it have been indicated, that substitutions in the gene *PRKN* (especially c.500 G > A, c.930 G > C and c.1180 G > A) were associated

with a slower progression of the disease and a better response to L-dopa pharmacotherapy. None of the subjects did not show the presence of mutations in exon 41 in the gene *LRRK2*. However, for the first time in the Polish population of patients with PD it have been demonstrated the presence of point mutations c.421 G>T and c.1195 G>A *HTRA2*, pointing to the participation of this gene in modulating the risk of PD. It have been also described two new mutations c.520 C>T *PRKN* probably associated with an increased risk of developing PD and lowering the age of onset and c.637 T>A mutation in codon 213 of the gene *SPR*, increasing the risk of PD, and the appearance of patients with PD symptoms of depression ( $p < 0.0001$ ). It seems that the simultaneous analysis of gene *PRKN*, *SPR*, *HTRA2* and *SNCA* may be important to improve diagnostic and prognostic processes in extrapyramidal system disorders and can contribute to the introduction of more effective therapy.

---

## 9. Piśmiennictwo

1. Friedman A.: *Choroba Parkinsona- mechanizmy, rozpoznawanie, leczenie*. Wydawnictwo Czelej, Warszawa 2005
2. Parkinson J.: *An essay on the shaking palsy*. Whittingham and Rowland for Sherwood, Needly and Jones, London 1817
3. *An essay shacking palsy* <[http://www.movementdisorders.org/james\\_parkinson/essay.html](http://www.movementdisorders.org/james_parkinson/essay.html)> dostęp: 12.09.2012
4. Goetz C.G.: *The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies*. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2011; 1:a008862
5. *Charcot and Parkinson's Disease* <[http://www.polyvore.com/charcot\\_parkinsons\\_disease\\_ncbi\\_bookshelf](http://www.polyvore.com/charcot_parkinsons_disease_ncbi_bookshelf)> dostęp: 12.09.2012
6. Tretiakoff C.: *Contribution a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson*. Paryż 1919
7. *Arvid Carlsson - A Superstar of Science* <<http://superstarsofscience.com/scientist/arvid-carlsson>> dostęp: 12.09.2012
8. Hornykiewicz O.: *The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain*. J. Neural. Transm. 2006; 70: 9-15
9. Golbe L.I., Di Ioro G., Bonavita V. i wsp.: *A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease*. Ann. Neurol. 1990; 27: 276
10. Maroteaux L., Campanelli J.T., Scheller R.H.: *Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal*. J. Neurosci. 1988; 8(8): 2804-2815
11. Hattori N., Kitada T., Matsumine H. i wsp.: *Molecular genetic analysis of a novel parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the parkin gene in affected individuals*. Ann. Neurol. 1998; 44: 935-941
12. Andlin-Sobocki P., Jönsson B., Wittchen H.-U. i wsp.: *Cost of disorders of the brain in Europe*. European Journal of Neurology 2005; 12 (s1): 1-27
13. Clarke C.E., Deane K.H.: *Ropinirole for levodopa - induced complications in Parkinson's disease*. Cochrane Database Syst. Rev. 2000; (3): CD001516
14. Koller W.C.: *Paraquat and Parkinson's disease*. Neurology 1986; 36(8): 1147
15. Shrang A., Hovris A., Morley D. i wsp.: *Young-versus older-onset Parkinson's disease: impact of disease and psychosocial consequences*. Mov. Disord. 2003; 18:1250-1256
16. De Rijk, M.C., Launer L.J., Berger K. i wsp.: *Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts*. Neurology 2000; 54: 21-23
17. Dorsey E.R., Constantinescu R., Thompson J.P. i wsp.: *Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030*. Neurology 2007; 68(5): 384-386

18. Hirtz D., Thurman D.J., Gwinn-Hardy K.: *How common are the "common" neurologic disorders?* *Neurology* 2007; 68 (5): 326-337
19. Lindgren P.: *Economic evidence in parkinson's disease: a review* *European Journal of Health Economics* 2004; s1: 62-65
20. *The European Parkinson's disease Standards of Care Consensus Statement 2011* The EPDA launches "unique" Consensus Statement 2011; vol. I
21. *A Manual of Diseases of the Nervous System, 1886* <[http://en.wikipedia.org/wiki/Parkinson's\\_disease](http://en.wikipedia.org/wiki/Parkinson's_disease)> dostęp: 12.09.2012
22. Korczyn A.D.: *Dementia in Parkinson's Disease*. *J. Neurol.* 2001; s3: III/1-III/4
23. Ziemssen T., Reichmann H.: *Non-motor dysfunction in Parkinson's disease*. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2007; 13: 323-332
24. Poewe W.: *Non-motor symptoms in Parkinson's disease*. *European J. Neurol.* 2008; 15 (s1): 14-20
25. Cheshire W.P., Wszolek Z.K.: *Body mass index is reduced early in Parkinson's disease*. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2005; 11: 35-38
26. Hoehn M.M., Yahr M.D.: *Parkinsonism: onset, progression and mortality*. *Neurology* 1967; 17: 427-442
27. Gibb W.R.: *Accuracy in the clinical diagnosis of parkinsonian syndromes*. *Postgrad. Med. J.* 1988; 64(751): 345-351
28. Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L. i wsp.: *Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1992; 55: 181-184
29. Oertel W.H., Wolters E., Sampaio C. i wsp.: *Pergolide versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease patients: The PELMOPET study*. *Mov. Disord.* 2006; 21(3): 343-353
30. Zgaljardic D.J., Foldi N.S., Borod J.C.: *Cognitive and behavioral dysfunction in Parkinson's disease: neurochemical and clinicopathological contributions*. *Journal of neural transmission* 2004; 111(10-11): 1287-1301
31. Poewe W., Mahlknecht P.: *The clinical progression of Parkinson's disease*. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2009; 15(s4): 28-32
32. Antonini A., De Notaris R., Benti R.: *Perfusion ECD/SPECT in the characterization of cognitive deficits in Parkinson's disease*. *Neurological Sciences* 2001; 22: 45-46
33. Suchowersky O., Gronseth G., Perlmutter J. i wsp.: *Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. Practice Parameter: neuroprotective strategies and alternative therapies for Parkinson disease (an evidence-based review); report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology*. *Neurology* 2006; 66: 976-982
34. Yahr M.D., Duvoison R.C., Scheer M.J. i wsp.: *Treatment of parkinsonism with levodopa*. *Arch. Neurol.* 1969; 21: 343-354
35. Fahn S., Oakes D., Shoulson I. i wsp.: *Parkinson Study Group. Levodopa and the progression of Parkinson's disease*. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351(24): 2498-2508
36. Fahn S. and the Parkinson Study Group: *Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease?* *J. Neurol.* 2005; 252 (s4): IV37-IV42

37. Schapira A.H.: *Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease*. Eur. J. Neurol. 2002; s3: 7-14
38. Bellucci A., Collo G., Sarnico I. i wsp.: *Alpha-synuclein aggregation and cell death triggered by energy deprivation and dopamine overload are counteracted by D2/D3 receptor activation*. J. Neurochem. 2008; 106(2): 560-577
39. Olanow C.W., Watts R.L., Koller W.C.: *An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease (2001): treatment guidelines*. Neurology 2001; 56(11 s5): 1-88
40. Horstink M., Tolosa E., Bonuccelli U. i wsp.: *Review of the therapeutic management of Parkinson's disease. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Movement Disorder Society-European Section. Part I: early (uncomplicated) Parkinson's disease*. Eur. J. Neurol. 2006; 13: 1170-1185
41. Pahwa R., Factor S.A., Lyons K.E. i wsp.: *Practice Parameter: treatment of Parkinson disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology*. Neurology 2006; 66: 983-995
42. Halliday G.M., Del Tredici K., Braak H.: *Critical appraisal of brain pathology staging related to presymptomatic and symptomatic cases of sporadic Parkinson's disease*. J. Neural. Transm. 2006; (70): 99-103
43. Trojanowski J.Q., Goedert M., Iwatsubo T. i wsp.: *Fatal attractions: abnormal protein aggregation and neuron death in Parkinson's disease and Lewy body dementia*. Cell Death Differ. 1998; 5(10): 832-837
44. Cookson M.R., Hardy J., Lewis P.A.: *Genetic Neuropathology of Parkinson's Disease*. INT. J. CLIN. EXP. PATHO. 2008; 1(3): 217-231
45. Goedert M., Clavaguera F., Tolnay M.: *The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases*. Trends Neurosci. 2010; 33(7): 317-325
46. Dzięwulska D., Rafałowska J.: *Rola zaburzeń przestrzennej budowy białek w patomechanizmie chorób układu pozapiramidowego*. Neurol. Neurochir. Pol. 2005; 39(5): 397-404
47. Dawson T.M., Dawson V.L.: *Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease*. Science 2003; 302: 819-822
48. Selkoe D.J.: *Folding proteins in fatal ways*. Nature 2003; 426: 900-904
49. Kozubski W., Dorszewska J.: *Apoptoza w chorobach ośrodkowego układu nerwowego*. Lublin, 2008
50. Sassi C.: *Genetics of Parkinson Disease*. Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease InTech 2011; 15-46
51. Clayton D.F., George J.M.: *The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease*. Trends. Neurosci. 1998; 21: 249
52. Recchia A., Debetto P., Negro A. i wsp.: *Alpha-synuclein and Parkinson's disease*. FASEB J. 2004; 18(6): 617-626
53. Bartels T., Choi J.G., Selkoe D.J.:  *$\alpha$ -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation*. Nature. 2011; 14: 107
54. *Structure of Parkinson's disease protein identified*  
<<http://www.brandeis.edu/now/2011/october/parkinsons.htm>> dostęp: 12.09.2012
55. *Research* <<http://www.yale.edu/rhoadeslab/research.html>> dostęp: 12.09.2012

56. Totterdell S., Meredith G.E.: *Localization of alpha-synuclein to identified fibers and synapses in the normal mouse brain*. Neuroscience 2005; 135(3): 907-913
57. Alim M.A., Hossain M.S., Arima K. i wsp.: *Tubulin seeds alpha-synuclein fibril formation*. J. Biol. Chem. 2002; 277: 2112
58. Cole N.B., Murphy D.D., Grider T. i wsp.: *Lipid droplet binding and oligomerization properties of the Parkinson's disease protein alpha-synuclein*. J. Biol. Chem. 2002; 277: 6344
59. Mak S.K., McCormack A.L., Langston J.W. i wsp.: *Decreased alpha-synuclein expression in the aging mouse substantia nigra*. Exp. Neurol. 2009; 220: 359
60. Michell A.W., Tofaris G.K., Gossage H. i wsp.: *The effect of truncated human alpha-synuclein (1-120) on dopaminergic cells in a transgenic mouse model of Parkinson's disease*. Cell Transplant 2007; 16(5): 461-474
61. Schneider B.L., Seehus C.R., Capowski E.E. i wsp.: *Overexpression of alpha-synuclein in human neural progenitors leads to specific changes in fate and differentiation*. Hum. Mol. Genet. 2007; 16(6): 651-666
62. Alves Da Costa C., Paitel E., Vincent B. i wsp.: *Alpha-synuclein lowers p53-dependent apoptotic response of neuronal cells. Abolishment by 6-hydroxydopamine and implication for Parkinson's disease*. J. Biol. Chem. 2002; 277(52): 50980-50984
63. Seo J.H., Rah J.C., Choi S.H. i wsp.: *Alpha-synuclein regulates neuronal survival via Bcl-2 family expression and PI3/Akt kinase pathway*. FASEB J. 2002; 16: 1826-1828
64. Webb J.L., Ravikumar B., Atkins J. i wsp.: *Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome*. J. Biol. Chem. 2003; 278: 25009
65. Bodles A.M., Guthrie D.J., Greer B. i wsp.: *Identification of the region of non-Abeta component (NAC) of Alzheimer's disease amyloid responsible for its aggregation and toxicity*. J. Neurochem. 2001; 78(2): 384-395
66. Palecek E., Ostatná V., Masarík M. i wsp.: *Changes in interfacial properties of alpha-synuclein preceding its aggregation*. Analyst. 2008; 133(1): 76-84
67. Conway K.A., Lee S.J., Rochet J.C. i wsp.: *Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97: 571
68. Golbe L.I., Di Ioro G., Bonavita V. i wsp.: *A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease*. Ann. Neurol. 1990; 27: 276
69. Krüger R., Kuhn W., Müller T. i wsp.: *Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Nat. Genet. 1998; 18: 106
70. Zarranz J.J., Alegre J., Gómez-Esteban J.C. i wsp.: *The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia*. Ann. Neurol. 2004; 55: 164
71. Pandey N., Schmidt R.E., Galvin, J.E.: *The alpha-synuclein mutation E46K promotes aggregation in cultured cells*. Exper. Neurol. 2006; 197: 515
72. Somme J.H., Gomez-Esteban J.C., Molano A. i wsp.: *Initial neuropsychological impairments in patients with the E46K mutation of the alpha-synuclein gene (PARK 1)*. J. Neurol. Sci. 2011; 310: 86



73. Narhi L., Wood S.J., Steavenson S. i wsp.: *Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation*. J. Biol. Chem. 1999; 274: 9843
74. Singleton A.B., Farrer M., Johnson J. i wsp.: *Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease*. Science 2003; 302: 841
75. Mutez E., Leprêtre F., Le Rhun E. i wsp.: *SNCA locus duplication carriers: from genetics to Parkinson disease phenotypes*. Hum. Mutat. 2011; 32: E2079
76. Goldstein D.S., Eisenhofer G., Kopin I.J.: *Clinical catecholamine neurochemistry: a legacy of Julius Axelrod*. Cell. Mol. Neurobiol. 2006; 26: 695
77. Goldstein D.S., Holmes C., Li S.T. i wsp.: *Cardiac sympathetic denervation in Parkinson disease*. Ann. Intern. Med. 2000; 133: 338
78. Sironi F., Trotta L., Antonini A. i wsp.: *Alpha-Synuclein multiplication analysis in Italian familial Parkinson disease*. Parkinsonism. Relat. Disord. 2010; 16: 228
79. Obi T., Nishioka K., Ross O.A. i wsp.: *Clinicopathologic study of a SNCA gene duplication patient with Parkinson disease and dementia*. Neurology. 2008; 70: 238
80. Nishioka K., Wider C., Vilarino-Guell C. i wsp.: *Association of alpha-, beta-, and gamma-Synuclein with diffuse lewy body disease*. Arch. of neur. 2010; 67: 970
81. Nishioka K., Ross O.A., Ishii K. i wsp.: *Expanding the clinical phenotype of SNCA duplication carriers*. Mov Disord 2009; 24: 1811-1819
82. Chiba-Falek O., Lopez G.J., Nussbaum R.L.: *Levels of alpha-synuclein mRNA in sporadic Parkinson disease patients*. Mov. Disord. 2006; 21: 1703
83. Fuchs J., Tichopad A., Golub Y. i wsp.: *Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain*. FASEB. J. 2008; 5: 1327
84. Mellick G.D., Maraganore D.M., Silburn P.A. i wsp.: *Australian data and meta-analysis lend support for alpha-synuclein (NACP-Rep1) as a risk factor for Parkinson's disease*. Neurosci. Lett. 2005; 375: 112
85. Tan E.K., Tan C., Shen H. i wsp.: *Alpha synuclein promoter and risk of Parkinson's disease: microsatellite and allelic size variability*. Neurosci. Lett. 2003; 336: 70
86. Maraganore D.M., de Andrade M., Elbaz A. i wsp.: *Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease*. JAMA. 2006; 296(6): 661-670
87. Trotta L., Guella I., Soldà G. i wsp.: *SNCA and MAPT genes: Independent and joint effects in Parkinson disease in the Italian population*. Parkinsonism Relat Disord. 2012; 18(3): 257-262
88. Spadafora P., Annesi G., Pasqua A.A. i wsp.: *NACP-REP1 polymorphism is not involved in Parkinson's disease: a case-control study in a population sample from southern Italy*. Neurosci Lett. 2003; 351(2): 75-78
89. Tan E.K., Matsuura T., Nagamitsu S. i wsp.: *Polymorphism of NACP-Rep1 in Parkinson's disease: an etiologic link with essential tremor?* Neurology 2000; 54(5): 1195-1198
90. *Key Protein Involved in Parkinson's Disease Redefined* <[http://labgrab.com/users/andrew-hau/blog/parkinsons\\_id%3D1127](http://labgrab.com/users/andrew-hau/blog/parkinsons_id%3D1127)> dostęp: 12.09.2012

91. Haggerty T., Credle J., Rodriguez O. i wsp.: *Hyperphosphorylated Tau in an  $\alpha$ -synuclein-overexpressing transgenic model of Parkinson's disease*. Eur. J. Neurosci. 2011; Epub w druku
92. Masliah E., Rockenstein E., Veinbergs I. i wsp.:  *$\beta$ -amyloid peptides enhance  $\alpha$ -synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001; 98: 12245
93. Hashimoto M., Rockenstein E., Mante M. i wsp.:  *$\beta$ -synuclein inhibits  $\alpha$ -synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor*. Neuron. 2001; 32: 213
94. Baptista M.J., O'Farrell C., Daya S.: *Co-ordinate transcriptional regulation of dopamine synthesis genes by alpha-synuclein In human neuroblastoma cell lines*. J. Neurochem. 2003; 85: 957
95. Dai J.G., Murakami K.: *Constitutively and autonomously active protein kinase C associated with 14-3-3 zeta in the rodent brain*. J. Neurochem. 2003; 84: 23
96. Lee D., Lee S.Y., Lee E.N. i wsp.: *Alpha-Synuclein exhibits competitive interaction between calmodulin and synthetic membranes*. J. Neurochem. 2002; 82: 1007
97. Eisenhofer G., Kopin I.J., Goldstein D.S. i wsp.: *Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine*. Pharmacol. Rev. 2004; 56: 331
98. Januszewicz W., Wocial B., Sznajderman M. i wsp.: *Guz chromochłonny*. Wyd. II. Warszawa 2000; Wydawnictwo Lekarskie PZWL
99. Lotharius J., Barg S., Wiekop P. i wsp.: *Effect of mutant  $\alpha$ -synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line*. J. Biol. Chem. 2002; 277: 38884
100. Ito S., Nakaso K., Imamura K. i wsp.: *Endogenous catecholamine enhances the dysfunction of unfolded protein response and alpha-synuclein oligomerization in PC12 cells overexpressing human alpha-synuclein*. Neurosci. Res. 2010; 66: 124
101. Pham C.L., Leong S.L., Ali F.E. i wsp.: *Dopamine and the dopamine oxidation product 5,6-dihydroxyindole promote distinct on-pathway and off-pathway aggregation of alpha-synuclein in a pH-dependent manner*. J. Mol. Biol. 2009; 387: 771
102. Da Costa C.A., Ancolio K., Checler F.: *Wild-type but not Parkinson's disease-related Ala53Thr mutant alpha-synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli*. J. Biol. Chem. 2000; 275: 24065
103. *Model illustrating how  $\alpha$ -synuclein protofibrils may be toxic in PD*  
<<http://www.mcmp.purdue.edu/faculty/?uid=rochet>> dostę: 12.09.2012
104. Lashuel H.A., Petre B.M., Wall J. i wsp.: *Alphasynuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils*. J. Mol. Biol. 2002; 322: 1089
105. Lucking C.B., Briece A.: *Alpha-synuclein and Parkinson's disease*. Cell. Mol. Life. Sci. 2000; 57: 1894
106. Ichinose H., Katoh S., Sueoka T. i wsp.: *Cloning and sequencing of cDNA encoding human sepiapterin reductase: an enzyme involved in tetrahydrobiopterin biosynthesis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991; 179: 183-189
107. Thony B., Heizmann C.W., Mattei M.-G.: *Human GTP-cyclohydrolase I gene and sepiapterin reductase gene map to region 14q21-q22 and 2p14-p12, respectively, by in situ hybridization*. Genomics 1995; 26: 168-170

108. Auerbach G., Herrmann A., Gütlich M. i wsp.: *The 1.25 Å crystal structure of sepiapterin reductase reveals its binding mode to pterins and brain neurotransmitters*. The EMBO Journal 1997; 16: 7219-7230
109. Kawai K., Fujimoto K., Okamoto A. i wsp.: *Transient activation of dihydropteridine reductase by Ca<sup>2+</sup>-activated proteolysis*. Zool. Sci. 2000; 17: 437-443
110. Fujimoto K., Takahashi S.Y., Katoh S.: *Mutational analysis of sites in sepiapterin reductase phosphorylated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II* Biochimica et Biophysica Acta 2002; 1594: 191-198
111. Bonafe L., Thony B., Penzien J. M. i wsp.: *Mutations in the sepiapterin reductase gene cause a novel tetrahydrobiopterin-dependent monoamine-neurotransmitter deficiency without hyperphenylalaninemia*. Am. J. Hum. Genet. 2001; 69: 269-277
112. McHugh P.C., Joyce P.R., Kennedy M.R.: *Polymorphisms of sepiapterin reductase gene alter promoter activity and may influence risk of bipolar disorder*. Pharmacogenet Genomics 2009; 19(5): 330-337
113. Steinberger D., Blau N., Goriunov D. i wsp.: *Heterozygous mutation in 5-prime-untranslated region of sepiapterin reductase gene (SPR) in a patient with dopa-responsive dystonia*. Neurogenetics 2004; 5: 187-190
114. Bikker H., Bakker H. D., Abeling N. G. G. M. i wsp.: *A homozygous nonsense mutation in the methylmalonyl-CoA epimerase gene (MCEE) results in mild methylmalonic aciduria*. Hum. Mutat. 2006; 27: 640-643
115. Friedman J., Hyland K., Blau N. i wsp.: *Dopa-responsive hypersomnia and mixed movement disorder due to sepiapterin reductase deficiency*. Neurology 2006; 67: 2032-2035
116. Abeling N. G., Duran M., Bakker H. D. i wsp.: *Sepiapterin reductase deficiency an autosomal recessive DOPA-responsive dystonia*. Molec. Genet. Metab. 2006; 89: 116-120
117. Verbeek M. M., Willemsen M. A. A. P., Wevers R. A. i wsp.: *Two Greek siblings with sepiapterin reductase deficiency*. Molec. Genet. Metab. 2008; 94: 403-409
118. Pankratz N., Uniacke S.K., Halter C.A. i wsp.: *Genes influencing Parkinson disease onset: replication of PARK3 and identification of novel loci*. Neurology 2004; 62(9): 1616-1618
119. West A.B., Zimprich A., Lockhart P.J. i wsp.: *Refinement of the PARK3 locus on chromosome 2p13 and the analysis of 14 candidate genes*. Eur. J. Hum. Genet. 2001; 9(9): 659-666
120. Sharma M., Mueller J.C., Zimprich A. i wsp.: *The sepiapterin reductase gene region reveals association in the PARK3 locus: analysis of familial and sporadic Parkinson's disease in European populations*. J. Med. Genet. 2006; 43: 557-562
121. DeStefano A. L., Lew M.F., Golbe L.I. i wsp.: *PARK3 influences age at onset in Parkinson disease: a genome scan in the GenePD study*. Am. J. Hum. Genet. 2002; 70: 1089-1095
122. Karamohamed S., DeStefano A.L., Wilk J.B. i wsp.: *A haplotype at the PARK3 locus influences onset age for Parkinson's disease: the GenePD study*. Neurology 2003; 61: 1557-1561
123. Tobin J.E., Cui J., Wilk J.B. i wsp.: *Sepiapterin reductase expression is increased in Parkinson's disease brain tissue*. Brain Res. 2007; 1139: 42-47

124. Sharma M., Maraganore D.M., Ioannidis J.P. i wsp.: *Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease Consortium. Role of sepiapterin reductase gene at the PARK3 locus in Parkinson's disease*. *Neurobiol. Aging*. 2011; 32(11): 2108.e1-5
125. Mata I.F., Lockhart P.J., Farrer M.J.: *Parkin genetics: one model for Parkinson's disease*. *Hum. Mol. Genet.* 2004; 13: 127
126. Cookson M.R.: *The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease*. *Nat. Rev. Neurosci.* 2010; 11(12): 791-797
127. Zimprich A., Biskup S., Leitner P. i wsp.: *Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology*. *Neuron*. 2004; 44(4): 601
128. Schapira A.H.: *The importance of LRRK2 mutations in Parkinson disease*. *Arch. Neurol.* 2006; 63(9): 1225
129. Tsika E., Moore D.J.: *Mechanisms of LRRK2-Mediated Neurodegeneration*. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2012; 12: 251-260
130. Funayama M., Hasegawa K., Kowa H. i wsp.: *A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1*. *Ann. Neurol.* 2002; 51(3): 296
131. Paisán-Ruiz C., Jain S., Evans E.W. i wsp.: *Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease*. *Neuron*. 2004; 44(4): 595-600
132. Lesage S., Ibanez P., Lohmann E. i wsp.: *French Parkinson's Disease Genetics Study Group G2019S LRRK2 mutation in French and North African families with Parkinson's disease*. *Ann. Neurol.* 2005; 58(5): 784
133. Williams-Gray C.H., Goris A., Foltynie T. i wsp.: *Prevalence of the LRRK2 G2019S mutation in a UK community based idiopathic Parkinson's disease cohort*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2006; 77(5): 665
134. Healy D.G., Falchi M., O'Sullivan S.S. i wsp.: *International LRRK2 Consortium Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study*. *Lancet Neurol.* 2008; 7(7): 583
135. Lee B.D., Dawson V.L., Dawson T.M.: *Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) as a potential therapeutic target in Parkinson's disease*. *Trends in Pharmacological Sciences* 2012; 33(7): 365-373
136. Ross O.A., Toft M., Whittle A.J. i wsp.: *Lrrk2 and Lewy body disease*. *Ann. Neurol.* 2006; 59(2): 388
137. Chen-Plotkin A.S., Yuan W., Anderson C. i wsp.: *Corticobasal syndrome and primary progressive aphasia as manifestations of LRRK2 gene mutations*. *Neurology* 2008; 70(7): 521
138. Ozelius L.J., Senthil G., Saunders-Pullman R. i wsp.: *LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews*. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354(4): 424
139. Clark L.N., Wang Y., Karlins E. i wsp.: *Frequency of LRRK2 mutations in early- and late-onset Parkinson disease*. *Neurology* 2006; 67(10): 1786
140. Białecka M., Hui S., Kłodowska-Duda G. i wsp.: *Analysis of LRRK2 G 2019 S and I 2020 T mutations in Parkinson's disease*. *Neurosci. Lett.* 2005; 390(1): 1-3
141. Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H. i wsp.: *A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death*. *Molec. Cell* 2001; 8: 613-621

142. Gray C.W., Ward R.V., Karran E. i wsp.: *Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response*. *Europ. J. Biochem.* 2000; 267: 5699-5710
143. Plun-Favreau H., Klupsch K., Moiso N. i wsp.: *The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase PINK1*. *Nat. Cell. Biol.* 2007; 9(11): 1243-1252
144. Jones J.M., Datta P., Srinivasula S.M. i wsp.: *Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice*. *Nature* 2003; 425: 721-727
145. Strauss K.M., Martins L.M., Plun-Favreau H. i wsp.: *Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease*. *Hum. Molec. Genet.* 2005; 14: 2099-2111
146. Simon-Sanchez J., Singleton A.B.: *Sequencing analysis of OMI/HTRA2 shows previously reported pathogenic mutations in neurologically normal controls*. *Hum. Molec. Genet.* 2008; 17: 1988-1993
147. Ross O.A., Soto A.I., Vilariño-Güell C. i wsp.: *Genetic variation of Omi/HtrA2 and Parkinson's disease*. *Parkinsonism Relat. Disord.* 2008; 14(7): 539-543
148. Lin C.H., Chen M.L., Chen G.S. i wsp.: *Novel variant Pro143Ala in HTRA2 contributes to Parkinson's disease by inducing hyperphosphorylation of HTRA2 protein in mitochondria*. *Human Genetics.* 2011; 130(6): 817-827
149. Bogaerts V., Nuytemans K., Reumers J. i wsp.: *Genetic variability in the mitochondrial serine protease HTRA2 contributes to risk for Parkinson disease*. *Hum. Mutat.* 2008; 29: 832-840
150. Wang Ch.-Y., Xu Q., Weng L. i wsp.: *Genetic variations of Omi/HTRA2 in Chinese patients with Parkinson's disease*. *Brain research* 2011; 1385: 293-297
151. Krüger R., Sharma M., Riess O. i wsp.: *A large-scale genetic association study to evaluate the contribution of Omi/HtrA2 (PARK13) to Parkinson's disease*. *Neurobiol. Aging.* 2011; 32(3): 548.e9-18
152. Zhang Y., Gao J., Chung K.K.K. i wsp.: *Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2000; 97: 13354-13359
153. Yoshii S.R., Kishi C., Ishihara N. i wsp.: *Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane*. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 19630-19640
154. Shimura H., Schlossmacher M.G., Hattori N. i wsp.: *Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease*. *Science* 2001; 293: 263-269
155. Sriram S.R., Li X., Ko H.S. i wsp.: *Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin*. *Hum. Molec. Genet.* 2005; 14: 2571-2586
156. Henn I.H.: *Parkin mediates neuroprotection through activation of IκB kinase/nuclear factor-κB signaling*. *J. Neurosci.* 2007; 27: 1868-1878
157. Rothfuss O., Fischer H., Hasegawa T. i wsp.: *Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair*. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18(20): 3832-3850
158. Kuroda Y., Mitsui T., Kunishige M. i wsp.: *Parkin affects mitochondrial function and apoptosis in neuronal and myogenic cells*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 348(3): 787-793
159. Jiang H., Cheng D., Liu W. i wsp.: *Protein Kinase C Inhibits Autophagy and Phosphorylates LC3*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010; 395: 471-476
160. Oyama G., Yoshimi K., Natori S. i wsp.: *Impaired in vivo dopamine release in parkin knockout mice*. *Brain Res.* 2010; 1352: 214-222

161. Hasegawa T., Treis A., Patenge N. i wsp.: *Parkin protects against tyrosinase-mediated dopamine neurotoxicity by suppressing stress-activated protein kinase pathways*. Journal of Neurochemistry 2008; 105(5): 1700-1715
162. Wong E.S., Tan J.M., Wang C. i wsp.: *Relative sensitivity of parkin and other cysteinecontaining enzymes to stress-induced solubility alterations*. J. Biol. Chem. 2007; 282(16): 12310-12318
163. Matsumine H., Saito M., Shimoda-Matsubayashi S. i wsp.: *Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27*. Am. J. Hum. Genet. 1997; 60: 588-596
164. Kitada T., Asakawa S., Hattori N. i wsp.: *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. Nature 1998; 392: 605-608
165. Pórolniczak A., Dorszewska J., Florczak J. i wsp.: *Badanie mutacji genu PARK2 w sporadycznych przypadkach choroby Parkinsona*. Folia Neuropathol. 2010; 48(4): 314
166. Wang H., Song P., Du L. i wsp.: *Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson's disease*. J. Biol. Chem. 2011; 286(13): 11649-11658
167. Foroud T., Uniacke S.K., Liu L. i wsp.: *Heterozygosity for a mutation in the parkin gene leads to later onset Parkinson disease*. Neurology 2003; 60: 796-801
168. Pórolniczak A., Dorszewska J., Florczak J. i wsp.: *Analysis of SNCA and PARK2 mutations in sporadic parkinson's disease*. Neurodegenerative diseases 2011; s1,11 CD-ROM
169. Hatano T., Hattori N.: *Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease*. Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease InTech 2011; 1-14
170. Sironi F., Primignani P., Zini M. i wsp.: *Parkin analysis in early onset Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat. Disord. 2008; 14(4): 326-333
171. Håkansson A., Carmine Belin A., Stiller C. i wsp.: *Investigation of genes related to familial forms of Parkinson's disease - With focus on the Parkin gene*. Parkinsonism and Related Disorders 2008; 14: 520-522
172. Kann M., Jacobs H., Mohrmann K. i wsp.: *Role of parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism*. Ann. Neurol. 2002; 51: 621-625
173. Periquet M., Lucking C.B., Vaughan J.R. i wsp.: *Origin of mutations in the parkin gene in Europe: exon rearrangements are independent recurrent events, whereas point mutations may result from founder effects*. Am. J. Hum. Genet. 2001; 68: 617-626
174. Chen R., Gosavi N.S., Langston J.W. i wsp.: *Parkin mutations are rare in patients with young-onset parkinsonism in a US population*. Parkinsonism Relat. Disord. 2003; 9(5): 309-312
175. Kozirowski D., Hoffman-Zacharska D., Sławek J. i wsp.: *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
176. Pórolniczak A., Kozubski W., Dorszewska J.: *Alfa-synukleina w chorobie Parkinsona*. Przegląd Lekarski 2013; w druku
177. Rudzińska M., Gatkowska I., Mirek E. i wsp.: *Choroba Parkinsona. Poradnik dla pacjentów i ich rodzin*. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego 2009

178. Litvan I., Bhatia K.P., Burn D.J. i wsp.: *SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders*. *Mov. Disord.* 2003; 18(5): 467-486
179. Folstein M.F., Folstein S.E., Fanjiang G. i wsp.: *MMSE – Krótka Skala Oceny Stanu Umysłowego*. Warszawa 2009
180. Lin J.J., Yueh K.C., Chang D.C. i wsp.: *Absence of G209A and G88C mutations in the alpha-synuclein gene of Parkinson's disease in a Chinese population*. *Eur. Neurol.* 1999; 42(4): 217-220
181. Choi J.M., Woo M.S., Ma H.I. i wsp.: *Analysis of PARK genes in a Korean cohort of early-onset Parkinson disease*. *Neurogenetics* 2008; 9(4): 263-269
182. Maguire-Zeiss K.A., Short D.W., Federoff H.J.: *Synuclein, dopamine and oxidative stress: co-conspirators in Parkinson's disease?* *Mol. Brain Res.* 2005; 134(1): 18-23
183. Ding T.T., Lee S.J., Rochet J.C. i wsp.: *Annular  $\alpha$ -synuclein protofibrils are produced when spherical protofibrils are incubated in solution or bound to brain-derived membranes*. *Biochemistry* 2002; 41: 10209-10217
184. Myhre R., Toft M., Kachergus J. i wsp.: *Multiple alpha-synuclein gene polymorphisms are associated with Parkinson's disease in a Norwegian population*. *Acta Neurol. Scand.* 2008; 118(5): 320-327
185. Kay D.M., Factor S.A., Samii A. i wsp.: *Genetic association between alpha-synuclein and idiopathic Parkinson's disease*. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2008; 147B(7): 1222-1230
186. Cronin K.D., Ge D., Manninger P. i wsp.: *Expansion of the Parkinson disease-associated SNCA-Rep1 allele upregulates human alpha-synuclein in transgenic mouse brain*. *Hum. Mol. Genet.* 2009; 18(17): 3274-3285
187. Białek P., Pótrolniczak A., Dorszewska J. i wsp.: *Mutations of the SNCA gene and alpha-synuclein level in the patients with diseases of the extrapyramidal system*. *Pharmacol. Rep.* 2011; 63(5): 1295
188. Al-Chalabi A.: *Genetic Variants of the  $\alpha$ -Synuclein Gene SNCA Are Associated with Multiple System Atrophy*. *PLoS One* 2009; 4: e7114
189. Ritz B., Rhodes S.L., Bordelon Y. i wsp.:  *$\alpha$ -Synuclein Genetic Variants Predict Faster Motor Symptom Progression in Idiopathic Parkinson Disease*. *PLoS One* 2012; 7(5): e36199
190. Hadjigeorgiou G.M., Xiromerisiou G., Gourbali V. i wsp.: *Association of alpha-synuclein Rep1 polymorphism and Parkinson's disease: influence of Rep1 on age at onset*. *Mov. Disord.* 2006; 21(4): 534-539
191. De Marco E.V., Tarantino P., Rocca F.E. i wsp.: *Alpha-synuclein promoter haplotypes and dementia in Parkinson's disease*. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2008; 147(3): 403-407
192. Kim Y.M., Jang W.H., Quezado M.M. i wsp.: *Mouradian Proteasome inhibition induces  $\alpha$ -synuclein SUMOylation and aggregate formation*. *MM. J. Neurol. Sci.* 2011; 307(1-2): 157-161
193. Guo J.F., Zhang X.W., Nie L.L. i wsp.: *Mutation analysis of Parkin, PINK1 and DJ-1 genes in Chinese patients with sporadic early onset parkinsonism*. *J. Neurol.* 2010; 257(7): 1170-1175
194. Pankratz N., Kissell D.K., Pauciulo M.W. i wsp.: *Parkinson Study Group-PROGENI Investigators Parkin dosage mutations have greater pathogenicity in familial PD than simple sequence mutations*. *Neurology* 2009; 73(4): 279-286
195. Macedo M.G., Verbaan D., Fang Y. i wsp.: *Genotypic and phenotypic characteristics of Dutch patients with early onset Parkinson's disease*. *Mov. Disord.* 2009; 24(2): 196-203

196. Clark L.N., Afridi S., Karlins E. i wsp.: *Case-Control Study of the Parkin Gene in Early-Onset Parkinson Disease*. Arch. Neurol. 2006; 63: 548-552
197. Oliveri R.L., Zappia M., Annesi G. i wsp.: *The parkin gene is not involved in late-onset Parkinson's disease*. Neurology 2001; 57: 359-62
198. Martínez H.R., González-González H., Cantú-Martínez L. i wsp.: *PARKIN-coding polymorphisms are not associated with Parkinson's disease in a population from northeastern Mexico*. Neurosci. Lett. 2010; 468(3): 264-266
199. Abbas N., Lucking C.B., Ricard S. i wsp.: *A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe*. Hum. Mol. Genet. 1999; 8: 567-574
200. Bardien S., Keyser R., Yako Y. i wsp.: *Molecular analysis of the parkin gene in South African patients diagnosed with Parkinson's disease*. Parkinsonism and Related Disorders 2009; 15: 116e121
201. Sinhaa R., Racetteb B., Perlmutterb J.S. i wsp.: *Prevalence of parkin gene mutations and variations in idiopathic Parkinson's disease*. Parkinsonism and Related Disorders 2005; 11: 341-347
202. Cookson M.R., Lockhart P.J., McLendon C. i wsp.: *RING finger 1 mutations in Parkin produce altered localization of the protein*. Hum. Mol. Genet. 2003; 12: 2957-2965
203. Brooks J., Ding J., Simon-Sanchez J. i wsp.: *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
204. Khan N.L., Scherfler C., Graham E. i wsp.: *Dopaminergic dysfunction in unrelated, asymptomatic carriers of a single parkin mutation*. Neurology 2005; 64: 134-136
205. Dorszewska J., Dębek A., Oczkowska A. i wsp. *Polymorphism of the PARK2 gene and Parkin protein levels in patients with Parkinson Disease*. 11th International Symposium on "Molecular Basis of Pathology and Therapy in Neurological Disorders". Warszawa, 2012
206. Chung K.K., Zhang Y., Lim K.L. i wsp.: *Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease*. Nat. Med. 2001; 7(10): 1144-1150
207. Deng H., Le W., Shahed J. i wsp.: *Mutation analysis of the parkin and PINK1 genes in American Caucasian early-onset Parkinson disease families*. Neurosci. Lett. 2008; 430: 18-22
208. Inzelberg R., Polyniki A.: *Are genetic and sporadic Parkinson's disease patients equally susceptible to develop dementia?* J. Neurol. Sci. 2010; 289(1-2): 23-26
209. Shimura H. i wsp.: *Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase*. Nat. Genet. 2000; 25: 302-305
210. Nuytemans K., Theuns J., Cruts M. i wsp.: *Genetic Etiology of Parkinson Disease Associated with Mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 Genes: A Mutation Update*. Hum. Mutat. 2010; 31(7): 763-780



## 10. Spis rycin

<b>Ryc. 1.</b> Pierwszy opis choroby Parkinsona autorstwa Jamesa Parkinsona z 1817 roku.....	2
<b>Ryc. 2.</b> Chory z chorobą Parkinsona. Rysunek Charcota z Maroco z 1889 roku.....	2
<b>Ryc. 3.</b> Arvid Carlsson.....	2
<b>Ryc. 4.</b> Liczba chorych na chorobę Parkinsona na świecie w 2005 roku i szacunkowa liczba chorych na chorobę Parkinsona w 2030 roku.....	2
<b>Ryc. 5.</b> Liczba chorych na chorobę Parkinsona w Polsce w 2005 roku i szacunkowa liczba chorych w 2030 roku.....	
<b>Ryc. 6.</b> Koszty rocznej opieki nad chorym na chorobę Parkinsona w wybranych państwach Europy.....	
<b>Ryc. 7.</b> Ilustracja przedstawiająca charakterystyczne cechy postawy ciała u osoby chorej na chorobę Parkinsona.....	
<b>Ryc. 8.</b> Przykładowy obraz badania PET u chorych z chorobą Parkinsona w różnym stadium zaawansowania choroby i osoby kontrolnej.....	
<b>Ryc. 9.</b> Histopatologiczny obraz przedstawiający neuryty i ciała Lewy'ego.....	
<b>Ryc. 10.</b> Schematyczne ujęcie mechanizmów potencjalnie włączonych w patomechanizm choroby Parkinsona.....	
<b>Ryc. 11.</b> Schemat budowy alfa-synukleiny.....	
<b>Ryc. 12.</b> Modele budowy alfa-synukleiny.....	
<b>Ryc. 13.</b> Etapy agregacji alfa-synukleiny.....	
<b>Ryc. 14.</b> Czynniki wpływające na agregację alfa-synukleiny.....	
<b>Ryc. 15.</b> Znaczenie destabilizacji struktury tetrameru alfa-synukleiny w zapoczątkowaniu procesów jej agregacji.....	
<b>Ryc. 16.</b> Wpływ dopaminy na wzrost neurotoksyczności alfa-synukleiny.....	
<b>Ryc. 17.</b> Model budowy reduktazy sepiapteryny.....	
<b>Ryc. 18.</b> Udział tetrahydrobiopteryny w biosyntezie dopaminy.....	
<b>Ryc. 19.</b> Udział tetrahydrobiopteryny w biosyntezie serotoniny.....	
<b>Ryc. 20.</b> Schemat budowy białka LRRK2 oraz jego sugerowane funkcje w komórce nerwowej ..	
<b>Ryc. 21.</b> Budowa oraz lokalizacja mutacji patogenicznych w obrębie genu LRRK2.....	
<b>Ryc. 22.</b> Aktywacja białka HTRA2 w komórce.....	

<b>Ryc. 23.</b> Zmiana struktury białka HTRA2 wywołana mutacją P143A.....	
<b>Ryc. 24.</b> Model budowy białka parkiny.....	
<b>Ryc. 25.</b> Schematyczne ujęcie roli parkiny w kierowaniu alfa-synukleiną na drogę degradacji w proteasomie.....	
<b>Ryc. 26.</b> Lokalizacja wybranych mutacji genu <i>PRKN</i> .....	
<b>Ryc. 27.</b> Rola wybranych genów <i>PARK</i> i ich produktów białkowych w patogenezie choroby Parkinsona.....	
<b>Ryc. 28.</b> Proces izolacji DNA z zastosowaniem cząstek magnetycznych.....	
<b>Ryc. 29.</b> Przykładowy profil temperaturowo-czasowy dla przeprowadzanej reakcji Real Time-PCR/High Resolution Melting.....	
<b>Ryc. 30.</b> Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR-RFLP eksonu 3 genu <i>SNCA</i> z zastosowaniem enzymu <i>MvaI</i> .....	
<b>Ryc. 31.</b> Przykładowy obraz rozdziału elektroforetycznego w żelu (A) i elektroforezy kapilarnej (B) produktów reakcji PCR promotora genu <i>SNCA</i> .....	
<b>Ryc. 32.</b> Częstość występowania poszczególnych alleli regionu <i>NACP-Rep1</i> promotora genu <i>SNCA</i> u osób badanych i kontrolnych. ....	
<b>Ryc. 33.</b> Częstość występowania poszczególnych genotypów regionu <i>NACP-Rep1</i> promotora genu <i>SNCA</i> .....	
<b>Ryc. 34.</b> Przykładowe rozdziały elektroforetyczne produktów reakcji PCR przeprowadzonej z zastosowaniem starterów wewnętrznych i zewnętrznych dla eksonów 2 i 4 genu <i>PRKN</i> .....	
<b>Ryc. 35.</b> Odsetek mutacji punktowych wykrytych w genie <i>PRKN</i> u osób badanych i kontrolnych.....	
<b>Ryc. 36.</b> Przykładowe wyniki analizy HRM dla eksonu 4 genu <i>PRKN</i> . ....	
<b>Ryc. 37.</b> Przykładowy fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 4 genu <i>PRKN</i> - mutacja c.500 G>A.....	
<b>Ryc. 38.</b> Przykładowy fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 4 genu <i>PRKN</i> -mutacja c.520 C>T.....	
<b>Ryc. 39.</b> Przykładowy fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 7 genu <i>PRKN</i> . ....	
<b>Ryc. 40.</b> Przykładowy fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 11 genu <i>PRKN</i> .....	
<b>Ryc. 41.</b> Odsetek osób z poszczególnymi mutacjami genu <i>PRKN</i> w eksonach 4, 7 i 11 w poszczególnych grupach osób badanych i kontrolnych.....	
<b>Ryc. 42.</b> Przykładowe wyniki analizy mutacji w eksonach 2 i 8 genu <i>PRKN</i> .....	
<b>Ryc. 43.</b> Częstość występowania mutacji c.930 G>C <i>PRKN</i>	

- w poszczególnych grupach badanych.....
- Ryc. 44.** Przykładowe wyniki analizy HRM eksonu 41 genu *LRRK2*. .....
- Ryc. 45.** Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR/RFLP eksonu 7 genu *HTRA2*  
 Fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 7 genu *HTRA2*  
 chorego z mutacją c.1195 G>A.....
- Ryc. 46.** Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR/RFLP eksonu 7 genu *HTRA2*. .....
- Ryc. 47.** Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR/RFLP eksonu 1 genu *HTRA2*.  
 Fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 1 genu *HTRA2*  
 chorego z mutacją c.421 G>T.....
- Ryc. 48.** Odsetek mutacji c421 G>T i c.1195 G>A wśród chorych z chP.....
- Ryc. 49.** Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR/RFLP genu *SPR*. Fluorogram  
 uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 3 genu *SPR* chorego z mutacją  
 c.637 T>A.....
- Ryc. 50.** Odsetek osób z wykrytą mutacją w genie *SPR* u osób badanych i kontrolnych.....
- Ryc. 51.** Odsetek chorych z chP, u których wykazano obecność mutacji *PRKN*.....
- Ryc. 52.** Przykładowy fluorogram uzyskany w wyniku sekwencjonowania eksonu 4  
 u chorego z podwójną mutacją genu *PRKN*. Strzałkami zaznaczono miejsca  
 substytucji.....

---

## 11. Spis tabel

<b>Tab. 1.</b> Skala zaawansowania choroby Parkinsona według Hoehn i Yakra.....	
<b>Tab. 2.</b> Opisane miejsca genowe dla rodzinnej choroby Parkinsona i odpowiadające im geny .....	
<b>Tab. 3.</b> Dotychczas opisane mutacje genu <i>SPR</i> związane z występowaniem dystonii.....	
<b>Tab. 4.</b> Dotychczas opisane mutacje genu <i>HTRA2</i> .....	
<b>Tab. 5.</b> Nasilenie różnych objawów klinicznych w chorobie Parkinsona i zaniku wieloukładowym .....	
<b>Tab. 6.</b> Dane demograficzne w analizowanych grupach osób.....	
<b>Tab. 7.</b> Kryteria włączenia i wyłączenia do badań w poszczególnych grupach.....	
<b>Tab. 8.</b> Aparatura laboratoryjna i sprzęt używany do izolacji DNA i przeprowadzenia badań genetycznych.....	
<b>Tab. 9.</b> Odczynniki używane w badaniach molekularnych zastosowane do izolacji DNA i analiz genetycznych.....	
<b>Tab. 10.</b> Wykaz analizowanych genów i mutacji/polimorfizmów.....	
<b>Tab. 11.</b> Sekwencje starterów stosowanych do analizy mutacji i polimorfizmów wybranych genów PARK.....	
<b>Tab. 12.</b> Wyznaczone temperatury przyłączania starterów oraz wielkości poszczególnych amplikonów.....	
<b>Tab. 13.</b> Skład mieszanin reakcyjnych dla metody PCR.....	
<b>Tab. 14.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej dla reakcji Real Time-PCR/High Resolution Melting przeprowadzanej dla genów <i>PRKN</i> i <i>LRRK2</i> .....	
<b>Tab. 15.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej dla metody RFLP .....	
<b>Tab. 16.</b> Enzymy restrykcyjne zastosowane do analizy mutacji genów <i>SNCA</i> , <i>PRKN</i> , <i>HTRA2</i> i <i>SPR</i> .....	
<b>Tab. 17.</b> Skład mieszaniny reakcyjnej dla metody PCR metodą RFLP.....	
<b>Tab. 18.</b> Liczba mutacji w eksonach 4, 7 i 11 genu <i>PRKN</i> w poszczególnych analizowanych grupach osób, stwierdzona i obliczona z prawa Hardy-Weinberga.....	
<b>Tab. 19.</b> Liczba osób z mutacjami w eksonach 2 i 8 w poszczególnych grupach badanych stwierdzona empirycznie i obliczona z prawa Hardego-Weinberga.....	
<b>Tab. 20.</b> Genotyp regionu NACP-Rep1 promotora genu <i>SNCA</i> u osób, u których wykazano współistnienie mutacji punktowych w genach PARK.....	

- Tab. 21.** Genotyp regionu NACP-Rep1 u osób u których wykazano obecność mutacji punktowych.....
- Tab. 22.** Wpływ oznaczonych mutacji punktowych genów *PRKN*, *HTRA2* i *SPR* na ryzyko ujawnienia się chP wyrażone ilorazem szans OR.....
- Tab. 23.** Korelacja pomiędzy obecnością oznaczonych mutacji/polimorfizmów w genach *PARK* i stopniem zaawansowania choroby Parkinsona w skali Hoehn-Yahra .....
- Tab. 24.** Korelacja pomiędzy obecnością oznaczonych mutacji w genie *PRKN* i odpowiedzią na farmakoterapię L-dopą u chorych z chorobą Parkinsona.....