

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2392.

ILLÉS ANETT

A humán molekuláris genetika és a géndiagnosztika alapjai
című program

Programvezető: Dr. Szalai Csaba, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Molnár Mária Judit, egyetemi tanár

A genetikai architektúra szerepének vizsgálata Parkinsonizmusban

Doktori értekezés

Illés Anett

Semmelweis Egyetem
Molekuláris orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Mária Judit, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Sipos Ildikó, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Hidasi Eszter, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Nagy György, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Molnár-Érsek Barbara, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Szegedi Róbert, Ph.D., főorvos

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1 Bevezetés	9
1.1 Parkinson-kór és kutatásunk célja	9
1.2 Parkinson-kór patomechanizmusa	9
1.3 A Parkinson-kór klinikai manifesztációja és diagnózisa	11
1.4 Parkinson-kór tüneteinek megjelenési ideje.....	13
1.5 A Parkinson-kór és a családi anamnézis kapcsolata	14
1.6 Parkinson-kór genetikai háttere	15
1.6.1 Monogénes Parkinson-kór	17
1.6.2 A Parkinson-kórra hajlamosító genetikai faktorok.....	39
1.7 A Parkinson-kór környezeti kockázati tényezői.....	41
2 Célkitűzések.....	43
3 Módszerek.....	44
3.1 A vizsgált betegek.....	44
3.2 DNS izolálása és tárolása	45
3.3 Sanger szekvenálás	45
3.4 MLPA.....	47
3.5 <i>C9orf72</i> fragment analízis	48
3.6 Újgenerációs szekvenálás.....	48
3.7 Bioinformatikai elemzés	49
3.8 Statisztikai elemzés.....	50
4 Eredmények	52
4.1 Szekvenálás és MLPA	52
4.1.1 Ritka, károsító eltérések PD-asszociált génekben, amelyek potenciálisan összeegyeztethetők a monogénes PD formával	52
4.1.2 Korábban már PD-vel asszociált genetikai rizikó variánsok	55
4.1.3 „Többszörös-találat” mechanizmus, amely befolyásolja a PD kockázatát58	
4.1.4 Monoallélikus heterozigóta variáns AR-PD-vel társított génekben	65
4.1.5 A <i>POLG</i> gén ritka variánsainak előfordulási gyakorisága a magyar PD kohortban.....	68
4.2 A <i>C9orf72</i> előfordulási gyakorisága a magyar PD kohortban	71

4.3	A környezeti és a genetikai rizikó tényezők kölcsönhatásának elemzése egy eset bemutatásán keresztül	73
5	Megbeszélés	77
5.1	A Parkinsonizmus-asszociált gének variáns elemzése a PD kohortban	77
5.1.1	Az azonosított kópiaszám eltérések és szerepük a rutin diagnosztikában	79
5.1.2	Korábban már PD-vel asszociált genetikai rizikó variánsok	79
5.1.3	„Többszörös-találat” mechanizmus és szerepe a PD-re való fogékonyságban	80
5.1.4	Monoallélikus heterozigóta variáns AR-PD-vel társított génekben	81
5.2	A <i>POLG</i> , mint nukleáris mitochondriális gén szerepe a Parkinson-kórban	83
5.3	A <i>C9orf72</i> előfordulási gyakorisága a magyar PD kohortban	84
5.4	A környezeti és a genetikai rizikó tényezők kölcsönhatása egy eset bemutatásán keresztül.....	86
5.5	A genetikai tanácsadás nehézségei – differenciáldiagnosztikai értelmezés.....	89
6	Következtetések	96
7	Összefoglalás	98
8	Summary.....	99
9	Irodalomjegyzék.....	100
10	Saját publikációk jegyzéke	141
11	Köszönetnyilvánítás	143
12	Mellékletek	144

Rövidítések jegyzéke

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics,

AD: autoszomális domináns,

AD-PD: autoszomális dominánsan öröklődő Parkinson-kór,

AF: amaurosis fugax,

AK: Alzheimer-kór,

ALO: szemhéjnyítási apraxia,

ALS: amyotrophias lateralis sclerosis,

AMI: akut myocardialis infarctus,

ANOVA: varianciaanalízis (analysis of variance),

ANS: ataxia neuropathia szindróma,

AOO: tünetek megjelenésének ideje (age of onset),

AR: autoszomális recesszív,

AR-NBIA: autoszomális recesszíven öröklődő neurodegeneráció agyi vas-felhalmozódással,

AR-PD: autoszomális recesszíven öröklődő Parkinson-kór,

ATP: adenzin trifoszfát,

ATP13A2: ATPase type 13A2,

ATXN2: ataxin-2,

Bax: Bcl-2-associated X protein,

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool,

C19orf12: chromosome 19 open reading frame 12,

C9orf72: chromosome 9 open reading frame 72,

CA: cerebrális atrophia,

CBD: corticobasalis degeneráció,

CHCHD2: coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain 2,

CHRNA7: cholinergic receptor, neuronal nicotinic, alpha polypeptide 7,

CI: kognitív hanyatlás,

CK: kreatin-kináz,

CNV: kópiaszám variáns (copy number variant),

COR: C-terminal of Roc,

COX: citokróm c oxidáz,

CP: ceruloplasmin,
CT: komputertomográfia,
CSF: cerebrospinális folyadék,
D: káros (damaging),
DA: dopamin,
DAT: dopamin transzporter,
DAT-SPECT/DaTscan: dopamin transzporter egyfotonos emissziós komputer tomográfia (dopamine transporter single-photon emission computed tomography),
dbNSFP: database for nonsynonymous SNPs' functional predictions,
DBS: mélyagyi stimuláció (deep brain stimulation),
DENN: differentially expressed in normal versus neoplastic,
DIP: gyógyszer-indukált Parkinsonizmus (drug-induced Parkinsonism),
DLB: Lewy testes demencia,
DM: diabetes mellitus,
DMSO: dimetilszulfoxid,
DNAJC13: DNAJ subfamily C member 13,
DNAJC6: DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6,
DNL: dopaminerg neuron vesztés,
DNS: deoxiribonukleinsav,
dNTP: deoxinukleotidtrifoszfát,
DQ: dózis kvóciens,
DRBA: dopaminreceptor-blokkoló szerek (dopamine receptor blocking agent),
DRD: dopa-reszponzív dystonia,
DTDS: dopamin transzporter hiányos szindróma,
Dupl: duplikáció,
EANM: European Association of Nuclear Medicine,
EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav,
EIF4G1: Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1,
EMG: elektromyographia,
EO: korai kezdetű (early onset),
ESP: Exome sequencing project,
F: familiáris,

FBXO7: F-box protein 7,
FPD: familiáris Parkinson-kór,
FTD: frontotemporális demencia,
FXTAS: fragilis X-asszociálta tremor/ataxia szindróma,
GATK: Genome Analysis Toolkit,
GBA: glucocerebrosidase,
GCHI: GTP cyclohydrolase 1,
GCS: glükozil-ceramid-szintáz,
GD: Gaucher-kór,
GEF: guanin-nukleotid kicserélő faktor,
GERD: gastroesophagealis reflux betegség,
GIGYF2: Grb10-Interacting GYF Protein-2,
gnomAD: Exome Aggregation Consortium Database and Genome Aggregation Database,
GWAS: genomra szintű asszociációs tanulmányok,
HD: Huntington kór,
HIF: hexanukleotid ismétlődés-feldúsulást,
HSP: örökletes spasticus paraparesis,
HTRA2: High-temperature requirement A2,
HVA: homovanillsav,
IMS: mitochondriális interembrán tér,
INAD: infantilis neuroaxonális disztrophia,
I: incontinentia,
iPD: idiopathias Parkinson-kór,
IPDGC: Nemzetközi PD Genomikai Konzorcium (International PD Genomics Consortium),
JO: juvenilis kezdetű (juvenilis onset),
LB: Lewy testek (Lewy bodies),
LCIG: Levodopa-carbidopa intestinalis gél,
l-DOPA: levodopa (l-3,4-dihydroxyphenylalanine),
LN: Lewy neurit,
LO: késői kezdetű (late onset),

LOPD: késői kezdetű Parkinson-kór,
LP: valószínűleg patogén,
LRRK2: leucin rich repeat kinase 2,
MA: Massachusetts állam,
MAF: minor allél frekvencia,
MCI: enyhe kognitív hanyatlás,
MD: mitochondriális rendellenességek,
MDS: Movement Disorder Society,
MgCl: magnézium-klorid,
MLPA: multiplex ligáció-függő próba amplifikáció,
MPAN: mitochondriális membránfehérje-asszociált neurodegeneráció,
MRI: mágneses rezonancia képalkotás (Magnetic Resonance Imaging),
mRNS: hírvívő (messenger) ribonukleinsav,
MSA: multisystemas atrophia,
mtDNS: mitochondriális DNS,
n: eset/darabszám,
N/A: nincs elérhető adat,
NBIA: agyi vas felhalmozódással járó neurodegeneratív betegség,
NCBI: National Center for Biotechnology Information,
NET: norepinefrin transzporter,
NGS: újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing),
NMJ: neuromuscularis junctio,
NSAID: nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek,
O: obstipatio,
OH: orthostaticus hypotensio,
OR: esély hányados (odds ratio),
PARK2: autoszomális recesszíven öröklődő juvenilis Parkinson-kór – 2
PARK7: Parkinsonism associated deglycase, Protein deglycase DJ-1,
PCA: progresszív cerebrális atrophia,
PCR: polimeráz láncreakció,
PD: Parkinson-kór (Parkinson's disease),
PEO: progresszív externális ophthalmoplegia,

PET: pozitron emissziós tomográfia (positron emission tomography),
PI: posturalis instabilitás,
PINK1: PTEN-induced kinase,
PKDYS1: infantilis parkinsonizmus-dystonia-1,
PLA2G6: phospholipase A2 group 6,
PODXL: podocalyxin-like protein,
POLG: DNA polymerase gamma, catalytic subunit,
PRKN: parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase,
PSP: progresszív supranuclearis paresis,
PTH2: parathyroid hormone 2,
PTRHD1: peptidyl-trna hydrolase domain-containing 1,
Rab: Ras-associated binding,
RBD: REM alvási zavar (rapid eye movement sleep behavior disorder),
REM: rapid eye movement,
RF: rizikó faktor,
RIC3: resistance to inhibitors of cholinesterase 3,
RLS: nyugtalan láb szindróma (restless leg syndrome),
RNS: ribonukleinsav,
ROS: reaktív oxigén gyök,
RRF: rongyos vörös rost,
rt-PCR: repeat-primed polimeráz láncreakció,
S: sporadikus,
SAC1: suppressor of actin 1,
SD: szórás,
SE: Semmelweis Egyetem,
SEMD: saccadicus szemmozgatási zavar (saccadic eye movement disorder),
SERT: szerotonin transzporter,
SLC6A3: solute carrier family 6 member 3,
SN: substantia nigra,
SNCA: alpha-synuclein,
SNGP: supranuclearis tekintés bénulás,
SNP: single nukleotid polimorfizmus,

SNpc: substantia nigra pars compacta,
SnpEff: SNP effect,
SPD: sporadikus Parkinson-kór,
SPECT: egyfotonos emissziós komputer tomográfia,
SPG11: spatacsin,
SYNJ1: synaptojanin-1,
TAE: Tris bázis, ecetsav és EDTA,
TMEM230: transmembrane protein 230,
UCHL1: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1,
UK: United Kingdom,
US: bizonytalan jelentőségű (variáns),
USA: United States of America,
VCF: Variant Call Format,
VGP: vertikális tekintés bénulás,
VPS13C: vacuolar protein sorting 13 homolog C,
VPS35: vacuolar protein sorting 35,
VUS: bizonytalan jelentőségű variáns,
WES: teljes exom szekvenálás,
WGS: teljes genom szekvenálás,
WPW: Wolff–Parkinson–White szindróma,
1KG: Genomes Project,

1 Bevezetés

1.1 Parkinson-kór és kutatásunk célja

A Parkinson-kór (Parkinson's disease: PD) a második leggyakoribb progresszív neurodegeneratív betegség az Alzheimer-kór után. Patogenezisében genetikai és környezeti tényezők is szerepet játszanak. A legfrissebb tanulmányok szerint körülbelül 6 millió ember érintett világszerte [1]. A 60 éves kor fölötti népesség 2%-át érinti, míg a 80 éves kor fölötti népességben ez az arány már 4%. A betegség 10%-a azonban már fiatal életkorban, 20 és 50 éves kor között jelentkezik [2]. A tünetegyüttest elsőként James Parkinson angol orvos írta le 1817-ben „Egy tanulmány a remegő bénulásról” (An Essay on the Shaking Palsy) című munkájában „reszkető bénulás” („Paralysis agitans”) néven [3]. Ezt az állapotot később, a tiszteletére Jean-Martin Charcot francia neurológus Parkinson-kórnak nevezett el [4]. Annak ellenére, hogy a PD tünetegyüttesét már több, mint 200 éve ismerjük, a háttérben álló patomechanizmusokat máig nem tudták teljesen feltárni. Az újgenerációs szekvenálás széles körű elterjedése lehetőséget nyújt a genetikai tényezők megismeréséhez. A genetikai ok-okozati viszonyok feltárása jelentős segítség lehet a betegség jobb megértésében és új terápiák kidolgozásában.

Kutatásaink a PD háttérben álló genetikai eltérések feltérképezésére, a fenotípus és a genotípus asszociációk szerepének elemzésére, valamint a környezeti hatások és genetikai tényezők interakciójának vizsgálatára irányultak. A jelenleg elérhető és a jövőbeni terápiás lehetőségek következtében különösen fontos a PD háttérben álló genetikai tényezők minél jobb megismerése. A betegek esetében a pontosabb prognózis és a családtervezés szempontjából az egyes azonosított eltérések és a fenotípus összefüggéseinek megértése nagyban hozzájárulhat a genetikai tanácsadás fejlődéséhez. Kutatásunk során ezért célunk volt az általunk vizsgált magyar csoportban a genetikai architektúra minél jobb leírása és olyan, eddig még nem vagy kevésbé vizsgált gének elemzése is, amely az újgenerációs szekvenálás alkalmazásával vált könnyebben elérhetővé.

1.2 Parkinson-kór patomechanizmusa

A tudományos ismeretek folyamatos növekedése ellenére sem egyértelműen tisztázott még, hogy pontosan milyen útvonalon, milyen fehérjéket érintve zajlik a PD-hez vezető neurodegeneráció. A motoros funkciózavarok háttérben elsősorban a substantia nigra

pars compacta (SNpc) sejtjeiben végbemenő dopaminerg idegsejtek pusztulása áll [5, 6]. Ennek következtében csökken a dopamin (DA) beáramlás a homloklebeny striatális motoros struktúráiba. A DA hiánya vagy a dopaminerg ingerületátvitel zavara megakadályozza a mozgatóműködés megfelelő szabályozását, és ez vezet végül a tipikus motoros tünetek megjelenéséhez, mint a tremor, a rigiditás és a bradykinesis [7, 8].

A PD egyik kórszövettani tulajdonsága az eosinophil citoplazmatikus zárványok (Lewy testek) megjelenése a substantia nigra (SN) neuronjaiban [9]. A Lewy testek (Lewy bodies: LB) elsősorban rosszul feltekeredett, hibás térszerkezetű α -synuclein fibrillumokból állnak [10]. Az oldhatatlan aggregátumok az idegsejteket károsítva neurodegenerációhoz vezetnek. Ez először a szaglórendszert, a perifériás autonóm idegrendszert, majd a SN dopaminerg neuronjait és késői stádiumban már a cortexet is érinti. Ez alapján a PD az α -synucleinopathiákhoz sorolható konformációs betegség [11]. Ezen kívül a PD progressziójában a kóros fehérje aggregáció mellett a mitochondriális diszfunkció, a neuroinflammáció és az excitotoxicitás is fontos szerepet játszik [9]. A mitochondriális diszfunkciót számos betegséggel hozták már összefüggésbe, köztük neurodegeneratív rendellenességekkel. Az idegsejtek esetében ugyanis különösen fontos a mitochondriumok megfelelő működése, a szinapszisok létrejötte és az akciós potenciálok továbbadása szempontjából [12, 13]. A neuroinflammáció során a központi idegrendszerben olyan reakciók mennek végbe, amelyek toxikus anyagokat (pl. reaktív oxigén gyököket (ROS)) termelnek és így neurodegenerációhoz vezetnek [14]. Az excitotoxicitás az a kóros folyamat, amely során az idegsejtek károsodnak vagy elpusztulnak a túlzott ingerlés következtében, amelyet egyes serkentő neurotranszmitterek (pl. glutamát) okoznak [15, 16]. Az excitotoxicitás szerepet játszhat a gerincvelő sérülésében, az agyvérzésben, a halláskárosodásban és a központi idegrendszer neurodegeneratív betegségeiben [17].

A klinikai diagnózis felállításában a növekvő patofiziológiai ismeretek ellenére a „gold-standard” továbbra is a klinikai-patológiai megerősítés, ahol a fő kritériumok az SNpc neuronok pusztulása és a LB jelenléte [18, 19]. A klinikai-patológiai vizsgálatok sok esetben jelentős eltérést mutattak ki a klinikai és a patológiai diagnózis között [20]. Továbbá az SNpc atrophia és az LB patológia olyan szindrómákban is jelen lehet, amelyek klinikailag nagyon különböznek a PD-től. Ezenkívül a legtöbb igazolt PD genetikai kockázati tényező heterogén neuropatológiai jellemzőkkel társul, amelyek

között nem minden esetben szerepel az LB patológia. Végezetül klinikai szempontból komoly előnyt jelenthet az LB patológia kialakulásának előrejelzése, mivel ilyen esetben az α -synucleint célzó terápiák hatásosak lehetnek.[21].

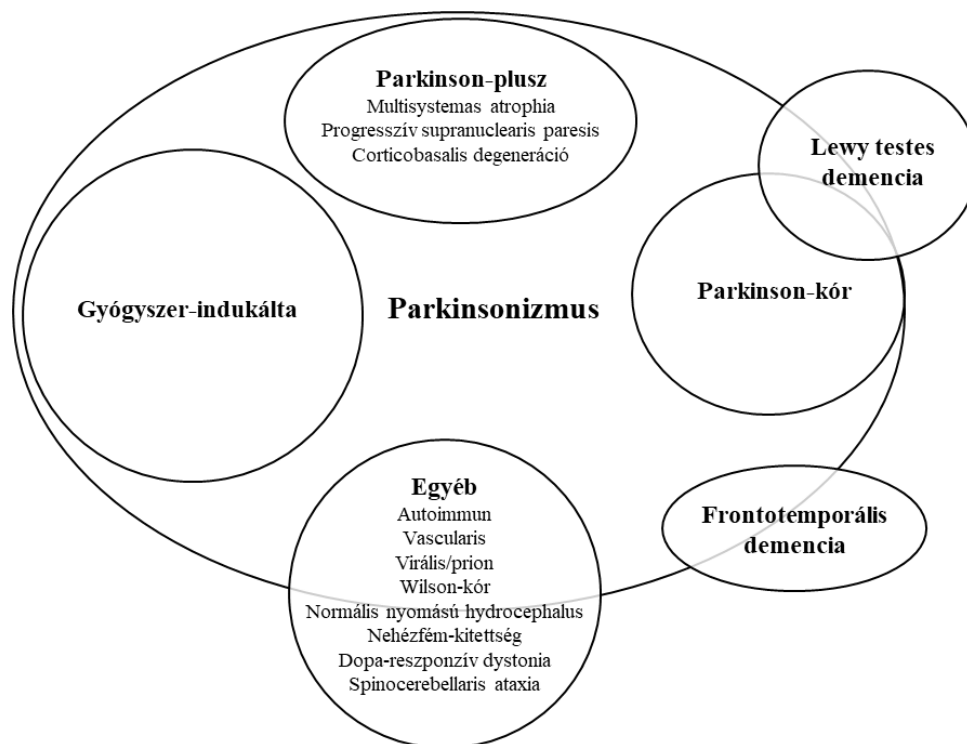
1.3 A Parkinson-kór klinikai manifesztációja és diagnózisa

A PD diagnózisa elsősorban a megjelenő motoros és nem motoros funkciózavarok széles spektrumán alapul. A legfontosabb motoros tünetek a nyugalmi tremor, a rigiditás, a bradykinesis és gyakran a posturalis instabilitás [22, 23]. Mozgással kapcsolatos gyakori tünet még a végtagügyetlenség, a járászavar, a mozgásindítási nehézség, a görnyedt testtartás, a hypomimia, a dysarthria és a micrographia. A motoros tünetek általában aszimmetrikusan jelennek meg, majd a betegség progressziójával fokozatosan bilaterálissá válnak, és egyéb abnormális mozgások, mint a posturalis vagy akciós tremor és a végtagi dystonia is megjelenhetnek. A PD diagnózist támogató egyik fontos jellemző a levodopa (l-3,4-dihydroxyphenylalanine; l-DOPA) kezelésre adott pozitív válasz [22, 23]. További egyensúlyzavarok és egyéb komplikációk, mint például a levodopa indukálta dyskinesis és a motoros fluktuáció is megjelenhetnek. A motoros tünetek alapján két altípust különböztethetünk meg: a tremor domináns és az akinetikus-rigid formát, de előfordul a kettő kombinációja is [24].

A tipikus motoros tüneteken kívül a nem-motoros tünetek is fontos részét képezik a tünetegyüttesnek. A leggyakoribb nem-motoros tünetek az insomnia, a depresszió, az anxietás, a REM alvási zavar (rapid eye movement sleep behavior disorder, RBD), a fáradékonyság, az autonóm diszfunkció, a kognitív hanyatlás és az érzékszervi rendellenességek (pl. hyposmia) [25]. Demencia és/vagy pszichózis a betegek 30-40%-ánál is előfordulhat [26]. Ma már tudjuk, hogy a nem-motoros tünetek megjelenése sokkal gyakoribb, mint kezdetben feltételezték. A PD-s betegek körében a nem-motoros tünetek prevalenciája a betegség súlyosságával és a progresszió mértékével együtt nő. A legtöbb érintettnél a betegség előrehaladtával vagy súlyosabb fenotípus esetén akár 6-10 nem-motoros tünet is jelentkezhet [2]. Továbbá egyre valószínűbb, hogy a nem-motoros tünetek sok esetben előrejelezhetik a motoros tünetek megjelenésének idejét [7, 27]. Ennek következtében a nem-motoros és a premotoros tünetek nagyon fontosak lehetnek a minél korábbi diagnózis felállításakor. Először is, már kezdeti állapotban elősegíthetné a különböző idegvédő stratégiák alkalmazását, és egy hatékony terápiás

megközelítés kidolgozását, amely lassíthatja a betegség progresszióját [28, 29]. Másodszor, mivel a motoros tünetek megjelenésekor a SN dopaminerg sejtjeinek már 70-80%-a elpusztult [30], ilyenkor a gyógyszeres kezelés már csak a tünetek enyhítésére alkalmas. Mivel a prodormalis állapot több év-évtized is lehet így ennek azonosítása kritikus jelentőségű a terápiás gyakorlatban.

Diagnosztikai bizonytalanság esetén, különösen a betegség korai szakaszában, az olyan neurológiai képalkotó technikákat, mint a dopamin transzporter egyfotonos emissziós komputer tomográfia (dopamine transporter single-photon emission computed tomography, DAT-SPECT/DaTscan) vagy a fluoro-dopa pozitron emissziós tomográfia (positron emission tomography, PET) lehet alkalmazni, hogy pontosabb képet kapjunk a dopaminerg neuronok állapotáról [31, 32]. A vizsgálat során az intravénásan beadott radiopharmakon megjelöli a dopamin transzportereket tartalmazó neuronokat. Az agy különböző régióiban a dopaminerg neuronok mennyisége SPECT vizsgálattal leképezhető. Noha ezek a vizsgálatok igazolhatják a dopaminerg diszfunkció jelenlétét, nem képesek különbséget tenni a PD és a Parkinsonizmus egyéb degeneratív formái, mint például az egyes Parkinson-plusz szindrómák (pl. multisystemas atrophia - MSA, progresszív supranuclearis paresis - PSP) között (1. ábra). A DAT-SPECT a leggyakrabban használt módszer, hogy megkülönböztessük a PD-t az esszenciális tremortól. Továbbá alkalmas arra is, hogy megállapítsuk, ha egy tünetekkel rendelkező beteg egyéb extrapyramidalis betegségben (pl. dopa-reszponzív dystonia - DRD) szenved. Az egyéb képalkotó vizsgálatok, mint például az agyi MRI (mágneses rezonancia képalkotás) a differenciál diagnosztika szempontjából fontosak, mint például a vascularis encephalopathia vagy a normális nyomású hydrocephalus elkülönítése.



1. ábra A Parkinsonizmus tünetegyüttes háttérében álló okok és csoportosításuk

Forrás: GeneReviews, módosítva.

Az 1. ábrán a PD differenciáldiagnosztikája szempontjából releváns nagy betegségcsoportokat mutatjuk be. A nomenklátúra szempontjából fontos megkülönböztetnünk néhány alapfogalmat. A Parkinsonizmus a legszélesebb kifejezés, ami az összes olyan rendellenességre utal, amely magában foglalja a bradykinesist, a rigiditást, a tremort és az egyensúlyzavart. A "Parkinson plus" kifejezés magában foglalja azokat a degeneratív állapotokat, amelyekben az egyes Parkinsonizmusra jellegzetes tünetek a klinikai képben dominálnak, de ezek mellett egyéb tünetek is megjelennek, például a MSA, a PSP és a corticobasalis degeneráció (CBD).

1.4 Parkinson-kór tüneteinek megjelenési ideje

A PD leggyakrabban 60 év körül alakul ki, de a tünetek ettől jelentősen eltérő időpontban is megjelenhetnek. A fiataloknál a Parkinsonizmus tünetei általában könnyebben azonosíthatók, idősebb életkorban azonban már kevésbé nyilvánvalók és felismerhetők, mivel vannak eredetileg az életkorral összefüggő jelenségek, mint például a bradykinesis [33]. A jelenleg legelfogadottabb csoportosítás az életkor szerint a következő: 20 év alatt juvenilis (juvenilis onset - JO), 20 és 50 év között korai (early onset - EO), 50 év felett

pedig késői (late onset - LO) PD-ről beszélhetünk. Fiatalkori megjelenésű (JO+EO) a PD esetek 15%-a, bár ezek az arányok populációnként eltérőek lehetnek [34]. Általánosságban elmondható, hogy minél fiatalabb korban jelentkezik a PD, annál nagyobb a valószínűsége a genetikai meghatározottságnak. Továbbá a különböző életkorban jelentkező PD tüneteiben és azok súlyosságában is nagy eltérések lehetnek. A JO és EOPD betegeknél gyakrabban jelentkezik fő tünetként a rigiditás és a dystonia, általában lassabban progrediál a betegség és a levodopa kezelésre is jobban reagálnak. Viszont jóval gyakrabban alakul ki náluk a levodopa kezelés mellékhatásaként dyskinesia [35, 36]. A LOPD betegek esetében egyes tanulmányok szerint domináns tünetként leggyakrabban tremor jelentkezik [37].

1.5 A Parkinson-kór és a családi anamnézis kapcsolata

A PD általában csak egy családtagban fordul elő (sporadikus eset - SPD); ritkábban több családtagnál is azonosítható (familiáris PD - FPD). Eddigi ismereteink alapján a PD betegek kb. 15%-ának PD-re pozitív a családi kórtörténete és 10%-ában beszélhetünk egyértelmű mendeli öröklésmentéről [38]. Az összes Parkinson-betegség esetében 5–10% körüli értékre becsülhető annak a valószínűsége, hogy a kóroki variáns egy adott génben azonosítható (monogénes forma) [39, 40]. Általánosságban elmondható, hogy a monogénes familiáris forma hátterében ritka, nagy penetranciájú patogén mutációk állnak, míg a sporadikus formák általában környezeti faktorok és genetikai hajlamosító tényezők együttes jelenlétéből fakadnak [41–44]. Eddig több mint 20 PD-vel szegregáló gént azonosítottak, amely monogénes formát okoz [2].

Nagyszámú beteg szenved a PD sporadikus formáiban, amelyeknél a betegség nem-mendeli öröklődési mintázatot mutat. Ennek ellenére ezek a formák a legtöbb esetben nem különíthetők el egyértelműen a familiáris formától a klinikai tünetek vagy a patológiai jelek alapján [39, 45]. Korai tanulmányok kimutatták, hogy a sporadikus esetek csak kis százalékában azonosítható mutáció olyan génben, mely előzőleg a familiáris formában került leírásra (pl. *SNCA*, *PRKN*, *LRRK2* és *GBA*)[46–48]. Habár a sporadikus esetek etiológiája nagyrészt továbbra sem ismert, az a feltételezés született, hogy hátterében olyan gyakori variánsok (MAF >1%) együttes hatása áll, amelyek a PD kockázat szempontjából különböző kis vagy közepes hatású genetikai lokuszokon fekszenek (átlagos OR ~1.2) [49, 50].

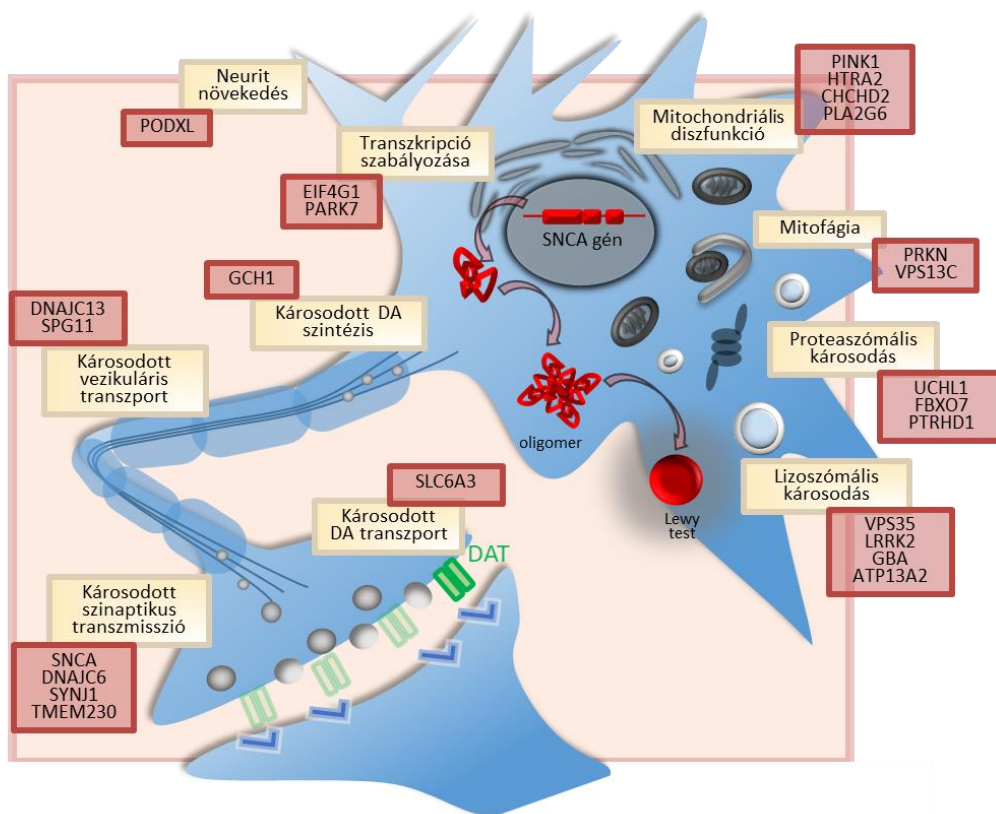
Egy GWAS (genom szintű asszociációs tanulmányok) metaanalízis során közel 8 millió genetikai variánst elemeztek európai származású PD-esetben és kontrollszemélyben, ennek eredményét tartalmazza a PDgene (<http://www.pdgene.org>) szabadon hozzáférhető online adatbázisa [51]. A növekvő genetikai információ ellenére a PD genetikai etiológiája az esetek 40%-ában még ma sem magyarázható [2, 52]. Jelenleg a nagy áteresztőképességű újgenerációs szekvenálás (next generation sequencing: NGS) és a nagy betegminták világszinten való elérhetősége (Nemzetközi PD Genomikai Konzorcium, IPDGC), lehetőséget teremt, hogy sok adatot gyűjtsünk össze a PD genetikai háttéréről. Ezáltal jobban megismerhetjük a betegséget és növelhetjük az új terápiák kifejlesztésének az esélyét. Az NGS technológiai fejlődése lehetővé tette többek között számos potenciális gén azonosítását, amelyek fontos szerepet játszhatnak a PD kialakulásában [53]. Ezen gének fehérjetermékei általában részt vesznek a mitochondriális és fehérjeminőség-ellenőrzési folyamatokban, a szinaptikus transzmisszióban és a vezikuláris reciklizációs folyamatokban az idegsejteken belül.

1.6 Parkinson-kór genetikai háttere

A PD a genetikai és a környezeti tényezők komplex kölcsönhatásának eredményeként alakul ki. Habár a genetikai tényezőket egyre inkább elfogadják mint kóroki faktorokat, ezek heterogenitása nagyban nehezíti az összefüggések pontosabb megértését. A PD-hez asszociált gének által kódolt fehérjék funkcionális vizsgálata a legtöbb esetben megmagyarázta a sejten belüli szerepüket és kapcsolatukat a PD patomechanizmusával (2. ábra). A mitochondriális diszfunkció és az autofágia zavara szerepet játszik a PD-hez kapcsolódó neurodegeneratív folyamatokban [54, 55]. A genetikai háttér heterogenitása miatt figyelembe kell venni, hogy a hasonló fenotípus mögött nagyon sok különféle genetikai ok húzódhat [56]. Bár a PD esetek nagy százalékában a genetikai vizsgálatok nem vezetnek eredményre, az első PD-vel asszociált génmutáció leírása óta [57] egyre több mendeli-örökléssel alapuló gént azonosítottak a betegség háttérében (1. táblázat, 2. táblázat). Ezekon a variánsokon kívül más – ismert és ismeretlen – genetikai és környezeti tényezők is hozzájárulhatnak az általános kockázathoz.

Az azonosított neuropatológiai kép alapján a Parkinsonizmussal társuló, genetikailag meghatározott synucleinopathiákhoz köthető géneket durván három csoportra lehet osztani: (1) gének, amelyeknél kimutatható az LB patológia, de még nem köthetők

egyértelmű PD szindrómához (pl. *C19orf12* és *GCH1*), (2) gének, amelyek klinikailag asszociálnak PD-vel, de LB patológiával nem mindig (pl. *LRRK2* és *PRKN*), és (3) gének, amelyek mind a PD klinikai szindrómához, mind az LB patológiához kapcsolódnak (pl. *SNCA* és *GBA*) [21]. Patológiai szempontból a PD-demencia és a Lewy testes demencia (DLB) hasonlóan tűnhet [18], és mindkettőt azonosították *SNCA* és *GBA* gének mutációit hordozó betegekben is [58]. A PD genetikai formáinak egyre mélyebb megértése rámutatott az autofágia/lizoszómális (*SNCA*, *VPS35* és *LRRK2*) és mitofágia/oxidatív stressz (*PRKN*, *PINK1* és *FBXO7*) útvonalak fontosságára a betegség patomechanizmusában [21]. A nemrégiben azonosított PD-kapcsolt gének, beleértve a *DNAJC6* és a *SYNJ1* ugyanakkor rámutattak a szinaptikus vezikulák endocitózisával kapcsolatos zavarokra is, amelyek jelentősen hozzájárulnak a betegség patogeneziséhez [59].



2. ábra A Parkinson-kór háttérében álló patomechanizmusok és az ezekkel asszociált gének kapcsolata

A dopaminerg neuronokban számos útvonal sérülése vezethet a neuronok pusztulásához. A bemutatott útvonalak több ponton egymással is kapcsolódnak és egymást erősítve fokozzák a káros hatást. A károsodott szinaptikus transzmisszió következtében többek

között sérül a DA turnover. Az α -synuclein felhalmozódás egyrészt életkori szövődmény, másrészt a hibás génszerkezet és/vagy a proteolitikus lebontási útvonal sérülése is szerepet játszhat benne. A mitochondriális diszfunkció elsődleges vagy másodlagos szövődmény is lehet, mely hatást a mitofágia hibás működése tovább súlyosbíthatja. Ezek az egymást is befolyásoló patogén útvonalak végül a striatonigralis dopaminerg neuronok pusztulásához és így PD kialakulásához vezetnek. [2, 64, 68] Rövidítések: DA: dopamin, DAT: dopamin transzporter. További forrás: GeneReviews, OMIM.

Bizonyos gének PD kockázatnövelő szerepe még kevésbé elfogadott, különösen olyan esetekben, ahol eddig csak egy vagy kevés családban igazolták kóroki szerepét, vagy ellentmondásos bizonyítékok születtek, illetve a kapcsolódó kockázat sem kellőképpen tisztázott [60–65]. Ezekben az esetekben a gének által kódolt fehérjék további szerkezeti és funkcionális vizsgálataira, valamint genetikai tesztekre is szükség van, hogy egyértelműen felismerjük a kóroki szerepüket [66–70].

1.6.1 Monogénes Parkinson-kór

A monogénes PD esetében az öröklésment szempontjából három csoportot különíthetünk el [68, 71, 72]: az autoszomális domináns hatású gének (autoszomális domináns PD – AD-PD), az autoszomális recesszív hatású gének (autoszomális recesszív PD – AR-PD), és az X-kromoszómához kapcsolt domináns hatású gének. A tünetek megjelenésének időpontja hasznos lehet az AD-PD (általában a tünetek megjelenésének ideje (AOO): >50 év) és az AR-PD (jellemzően az AOO: <40 év) megkülönböztetésében [73]. A fiatal korban fellépő PD esetében a klinikai kép gyakran tartalmaz társuló tüneteket, mint például a dystonia, a spasticitás és a demencia. Fontos hangsúlyozni, hogy sok esetben az azonos genetikai variánssal rendelkező betegeknél is egyéni különbségek lehetnek az AOO-ban és a megnyilvánuló tünetekben.

1.6.1.1 Autoszomális domináns Parkinsonizmus háttérben álló gének

Az autoszomális domináns Parkinsonizmus háttérben álló géneket az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat Autoszomális domináns öröklésmentet mutató gének [2, 64, 68]

Rövidítésjegyzék: AOO: tünetek megjelenésének ideje, EO: korai kezdetű, LO: késői kezdetű, T: típusos, AT: atípusos, iPD: idiopathiás Parkinson-kór, SEMD: saccadicus szem mozgatási zavar, ak-rig: akinetikus-rigid forma, RLS: nyugtalan láb szindróma, CI: kognitív hanyatlás, N/A: nincs elérhető adat, RBD: REM alvási zavar, LB :Lewy testek, LN: Lewy neuritok, DNL: dopaminerg neuron vesztés, Tau pat.: Tau patológia, +: jó válasz, +/-: enyhe válasz, -: nincs válasz, Prog: progresszió, Pen: penetrancia, Frek: frekvencia, SPD: sporadikus Parkinson-kór, FPD: familiáris Parkinson-kór, RF: rizikó faktor, ALS: amyotrophias lateralis sclerosis, FTD: frontotemporalis demencia. További forrás: GeneReviews, OMIM.

Gén	AOO	Klinikai kép	Nem-motoros tünetek	Levodopa válasz	Neuropatológia	Megjegyzés
<i>SNCA</i>	EO/LO	T/AT cerebellaris + pyramis jel, myoclonus	pszichiátriai tünetek, CI, demencia, hallucináció, dysautonomia	+ +/-	LB, LN, DNL	Prog: gyors Frek: SPD: 0,2%, FPD: 1-2% Promoter + 3' vég polimorfizmusai – RF
<i>LRRK2</i>	LO	T (LO-iPD)	hyposmia, CI, demencia, hallucináció, alvászavar	+ (88%)	LB +/-, DNL +/-; Tau pat.	Frek: kaukázusi SPD: 1%, FPD: 5-15% Pen: inkomplett, életkor függő.
<i>VPS35</i>	EO/LO (50-52 év)	T	kognitív/pszichiátriai tünetek ritkák	+	N/A	Pen: inkomplett, életkor, variáns, etnikum függő Frek: ritka (<1%).
<i>GCHI</i>	EO (43 év)	T	hyposmia, mindenkinél volt CI, alvászavar, dysautonomia	+	LB, DNL	Pen: inkomplett, nem függő Prog: fokozatos.
<i>ATXN2</i>	EO	AT cerebellaris ataxia, SEMD	nincs demencia	+	LB, DNL	CAG ismétlődés expanzió

Gén	AOO	Klinikai kép	Nem-motoros tünetek	Levodopa válasz	Neuropatológia	Megjegyzés
<i>C9orf72</i>	EO/LO (27-85 év)	T/AT ak-rig, tremor nélkül	executív, térbeli és nyelvi diszfunkció, CI, demencia	-	N/A	GGGGCC ismétlődés-expanszió, ALS/FTD Pen: életkor függő Prog: gyors
<i>DNAJC13</i>	EO/LO (40-83 év)	T	N/A	+ (korai fázisban)	LB, LN, DNL	Prog: lassú (8-17 év) Ellentmondásos bizonyítékok
<i>EIF4G1</i>	LO (50-80 év)	T	nincs CI	+	LB	Prog: lassú Ellentmondásos bizonyítékok
<i>RIC3</i>	EO/LO (30-68 év)	T RLS	RBD, depresszió, auditorikus hallucináció	+	ND	Egyetlen/Kevés családban közölt genetikai variánsok
<i>TMEM230</i>	LO (67 év)	T	N/A	+	LB, DNL	
<i>UCHL1</i>	EO/LO (50-59 év)	T	N/A	+	N/A	További megerősítésre van szükség a kapcsolódó kockázat tisztázásához
<i>GIGYF2</i>	EO/LO	T	N/A	+	N/A	
<i>HTRA2</i>	LO	T	N/A	+	N/A	
<i>CHCHD2</i>	EO/LO (40-67 év)	T hyperreflexia	depresszió, nincs demencia	+	N/A	

1.6.1.1.1 SNCA

Az α -synuclein volt az első PD-vel (PARK1) asszociált gén, amelyet már 1996-ban leírtak [74]. A gén egy preszinaptikus proteint kódol, amely fontos szerepet játszik a szinaptikus transzmisszióban [75]. Számos in vivo tanulmány bizonyította, hogy az SNCA befolyásolja a szinaptikus vezikulák reciklizációját és mobilizációját az axon terminálisok közelében [76]. A szinaptikus plaszticitással is összefügg azáltal, hogy serkenti a neurotranszmitterek felszabadulását az axon terminálisokban [77]. Továbbá van egy lehetséges negatív szabályozó szerepe a tirozin hidroxiláz aktivitásra, mely a sebesség limitáló lépés a DA bioszintézise során [78]. A génben bekövetkezett mutációk toxikus hatással vannak a DA neuronokra. A mutáns α -synucleinnek csökken az affinitása a lipidekhez, emiatt koncentráció függő módon megnő az oligomerizáció mértéke, mely végül a toxikus α -synuclein kötegek felhalmozódásához vezet, amely a LB legfőbb komponense [79]. Továbbá létezik olyan feltételezés, amely szerint az α -synuclein mutáció következtében kialakuló neurotranszmitter kibocsátásában bekövetkező deficit a DA citoplazmatikus akkumulációjához, növekvő oxidatív stresszhez és metabolikus diszfunkciókhoz vezethet a dopaminerg sejtekben [76]. Ez a folyamat a DA növekvő enzimikus és nem-enzimikus oxidálódásához vezet [80].

Az SNCA génben eddig 3 különböző patogén mutáció típust azonosítottak: (1) misszensz pontmutáció a kódoló régióban, (2) dinukleotid repeat variáció a promoter régióban, és (3) duplikáció vagy triplikáció. A két utóbbi eset az SNCA gén kóros mértékben expresszálódó vad-típusú fehérje molekuláinak felhalmozódását eredményezi [81, 82]. A leggyakoribb mutációja (A53T) például gyakran demenciával társuló EOPD-t okoz, míg a A30P és a E46K mutációk késői indulást eredményeznek. Jelenleg patogén kóroki tényezőként több heterozigóta kópiaszámváltozás (duplikáció, triplikáció) és 5 misszensz pontmutáció ismert [68]. Érdekes módon a pontmutáció és a triplikáció hordozók esetében majdnem komplett penetrancia figyelhető meg, míg a duplikációt hordozók esetében ez az arány csak 30-50% közé esik. A triplikációt hordozók esetében korábbi indulás és súlyosabb fenotípus figyelhető meg, mint a duplikációs esetekben [21].

1.6.1.1.2 LRRK2

Az LRRK2 (Leucine-rich repeat kinase 2) gén 51 exonnal rendelkezik, az általa kódolt fehérje a dardarin, ami baszk nyelven remegést jelent [83]. Az LRRK2 mutációk penetranciája nagy mértékben függ az életkortól: 45 éves kor alatt kevesebb, mint 20%,

80 éves korban pedig 75–80%-ra tehető [72, 84, 85]. A *LRRK2* variánsok becsült penetranciája magasabb vagy alacsonyabb lehet, amely valószínűleg a variáns génen belüli elhelyezkedésével függ össze [86]. Más tényezők, például gén-gén interakciók feltételezhetően befolyásolják az *LRRK2* hibája miatt kialakuló betegség kockázatát vagy a motoros tünetek megjelenését [72]. Bár több száz misszensz és nonszensz *LRRK2* gén variánsról számoltak be világszerte, a jelenleg elérhető adatbázisban csak 12 mutációt hivatkoznak patogénként (ClinVar adatbázis, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>). Az eddig azonosított misszensz mutációk a teljes *LRRK2* fehérjét érintik, és jelen van az összes potenciális funkcionális doménben. Sajnos a kódoló exonok nagy száma miatt a közölt tanulmányoknak csak kis része vizsgálta a teljes kódoló régiót és a legtöbb tanulmány a funkcionálisan releváns fehérje doméneket kódoló exonokra összpontosított [87]. Csak néhány vizsgálatban elemezték a *LRRK2* gén potenciális kópiaszám változásait, de nem azonosítottak exoni méretű duplikációt vagy deléciót [88, 89].

A *LRRK2* génben bekövetkező mutációk a PD gyakori genetikai okaként ismertek (PARK8), a leggyakoribb G2019S mutáció felelős a familiáris AD-PD legalább 4%-áért, amelyek jellemzően késői megjelenéssel járnak, ezen kívül a sporadikus PD 1%-ában is megtalálhatók [90]. Az *LRRK2* gén mutációi közül kiemelkedően magas gyakorisággal rendelkezik a G2019S és a R1441 kodont megváltoztató mutációk. Azonban a G2019S aminosav csere gyakorisága a különböző vizsgált populációkban jelentősen eltér, az európai esetek 1-5%-ában azonosítható, míg az észak-afrikai betegeknél ez a szám több, mint 1/3 [91, 92]. A gyakoriság etnikai csoportokonként változik: a leggyakoribb az észak-afrikai arabok (36% családi, 39% sporadikus) és az askenázi zsidók (28% családi, 10% sporadikus) körében. Vagyis a *LRRK2* gén egyszerre lehet felelős AD-PD kialakulásáért és növelheti a SPD megjelenésének a kockázatát [93]. Szerepéről mint kockázati tényező az 1.6.2. fejezetben számolunk be bővebben.

A *LRRK2* szabályozza a mitochondriális dinamikát a mitochondriális fisszió/fúzió számos kulcsszabályozójával kölcsönhatásban, amely fontos tényező a PD patogenezisében [2, 94]. Néhány PD-hez kapcsolódó mutáció a *LRRK2* génben fokozza a fehérje kináz aktivitását, ami toxikus funkció nyeréses mechanizmusra utal. Az *LRRK2* kináz aktivitás fokozódása növeli a mitochondriális fragmentációt, amely a mitochondriális diszfunkcióval és a megnövekedett ROS-termeléssel együtt fokozza az oxidatív stressz kialakulásának valószínűségét [2].

1.6.1.1.3 VPS35

Teljes exom szekvenálás segítségével 2011-ben a *VPS35* (vacuolar protein sorting 35) gén patogén mutációiról számoltak be mint az AD-PD oka egy nagy svájci családban, ahol klinikai képként késői kezdetű tremor-domináns Parkinsonizmust azonosítottak (*PARK17*) [95]. A legfrissebb tanulmányok szerint a *VPS35* gén a retromer cargo-felismerő komplex egyik alkotórészét kódolja, és kritikus szerepet játszik a cargo endoszómától a transz-Golgi hálózathoz történő visszajuttatásában [96–98]. Úgy tűnik, hogy a domináns-negatív mutációk a *VPS35*-ben a retromer komplex diszfunkciót okozzák, és a későbbiekben a lizoszómális proteolízis is károsodik, amely elengedhetetlen a lizoszóma mediálta megfelelő fehérje minőség-ellenőrzési útvonalakhoz [96, 99, 100]. Ezen túlmenően Miura és mtsai. kimutatták, hogy a *VPS35* gén *Drosophila melanogaster*-ben történő kiütése az α -synuclein toxikus felhalmozódásához vezet az idegsejtekben, ami tovább erősíti a *VPS35* szerepét a PD patogenezisében [101].

1.6.1.1.4 GCHI

A *GCHI* a GTP cyclohydroláz 1-et kódolja, és részt vesz a monoaminok (pl. dopamin) és a tetrahydrobiopterin szintézisében, amely több enzim kofaktora (pl. tirozin-hidroxiláz) [102]. A *GCHI* mutációi a DRD leggyakoribb oka, amely gyermekkorban jelentkezik és nagyon jól reagál a dopaminerg kezelés kis adagjaira [102]. A PD egy másik neurológiai fenotípus, amelyet a *GCHI* mutációival kapcsolatban leírtak [103]. A Parkinsonizmus oka ezekben az esetekben valószínűleg a nigrostriális degenerációból származik, és nem pusztán a metabolikus *GCHI*-hez kapcsolódó striális DA hiány fenotípusos spektrumának részét képezi [104]. Ez összhangban áll azokkal a képalkotó eredményekkel, ahol felnőttkori Parkinsonizmusban szenvedő *GCHI* mutációhordozókat vizsgáltak és rendellenes nigrostriális képet azonosítottak. Így, míg a *GCHI* mutációk általában gyermekkorban kezdődő nem-neurodegeneratív DRD-ként jelennek meg LB patológia nélkül, addig a betegek egy részénél késői kezdetű Parkinsonizmus alakul ki, amely nigrostriális degenerációval és LB patológiával jár együtt és klinikai megjelenése utánozhatja az idiopathias PD-t (iPD) [21].

1.6.1.1.5 ATXN2

Az elmúlt évtizedben a Parkinsonizmus területén végzett kutatások összefüggést írtak le a CAG ismétlődő kiterjedései között az Ataxin-2 (*ATXN2*) gén kódoló régiójában és a PD

dominánsan öröklött családi formái között [105, 106]. A klinikai vizsgálatok azt sugallják, hogy a cerebellaris ataxia általában a domináns tünet a betegek körében, azonban gyakran mutatnak néhányat a Parkinsonizmus tünetei közül [107, 108]. Noha az *ATXN2* biokémiai funkciója jelenleg ismeretlen, a *Drosophila melanogasterben* végzett molekuláris alapján az *ATXN2* szerepet játszhat az mRNS-ek egy részhalmozásának transzportjában, stabilitásában és translációjának szabályozásában az idegsejteken belül [109–111]. Úgy tűnik, hogy a CAG ismétlődés-expanziója az *ATXN2* kódoló szekvenciáin belül egy poliglutamin (poly Q) traktus kiterjedését eredményezi. Ez bizonyos mRNS-ek translációs diszregulációját okozhatja, és később kiválthatja a dopaminerg neuronok degenerációját az agyban [111, 112].

1.6.1.1.6 *DNAJC13*

A *DNAJC13* (DNAJ subfamily C member 13) gén egy endoszómális fehérjét kódol, amely részt vesz a vezikulák klatrin burkának kialakításában és az intracelluláris transzportban [2]. Elsőként a N855S mutációt a *DNAJC13* génben egy nagy kanadai családban exom szekvenálással azonosították, de két beteg nem hordozta a mutációt, és ezért fenokópiának tekintették őket (PARK21) [95]. Feltételezhető, hogy a *DNAJC13* génben fellépő toxikus funkciónyeréses mutációk miatt az intracelluláris transzport csökkenés közvetlen eredménye az α -synuclein felhalmozódás, vagyis az α -synuclein-pozitív LB-k jelenléte [113].

1.6.1.1.7 *EIF4G1*

Elsőként a *EIF4G1* (Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1) génben lévő mutációt egy AD-PD-vel érintett nagy francia családban azonosították (PARK18). Majd számos különböző kohortból származó családban is sikerült a gén érintettségét igazolni (pl. USA, Kanada, Írország, Olaszország és Tunézia) [114].

Az EIF4G gén család egy nagy állványfehérjét kódol, amely kulcsfontosságú iniciációs tényező az mRNS molekulák translációjában az eukarióta sejteken belül. Ugyanis a több alegységből álló translációs iniciációs faktor komplexet toborozza az mRNS-ek 5'-végéhez [115]. Az *EIF4G1* szelektíven szabályozza olyan fehérjék translációs iniciációját, amelyek a sejtekre ható különféle stressz faktorokra reagálva befolyásolják a mitochondriális aktivitást, a sejtes bioenergetikát, a sejtek növekedését és a proliferációt [116, 117]. Az *EIF4G1* mutációi megváltoztatják azoknak a meglévő mRNS-eknek a translációját, amelyek nélkülözhetetlenek az idegsejtek túlélésében, valamint

megakadályozzák, hogy az idegsejtek gyorsan és dinamikusan reagáljanak a stresszre [114].

1.6.1.1.8 *RIC3*

Nemrégiben egy *RIC3* (resistance to inhibitors of cholinesterase 3) mutációt azonosítottak egy indiai családban teljes exom szekvenálás alkalmazásával [118]. A c.169C>A (P57T) mutáció kilenc érintett személynél volt jelen három generáció alatt, és az egészséges személyekben nem volt azonosítható. Ez a gén a *CHRNA7* (cholinergic receptor, neuronal nicotinic, alpha polypeptide 7) acetilkolin receptorral társított proteint kódolja, amely az idegsejtek kalcium beáramlásában résztvevő kolinerg receptor. In vitro vizsgálatok kimutatták, hogy a *RIC3* mutációi a sejtmembránokon a *CHRNA7* csökkenését eredményezik [118]. Mivel korábban még nem azonosították a *RIC3* gént más betegséggel és egyelőre más *RIC3*-mutációval rendelkező családot sem írtak le, jelenleg nem vonhatunk le végleges következtetést a *RIC3* patogénitásával kapcsolatban.

1.6.1.1.9 *TMEM230*

A *TMEM230* (transmembrane protein 230) egy transzmembrán fehérjét kódol, amely részt vesz a szinaptikus vezikulák forgalmában, és része a LB-nek és a Lewy neuritoknak [119]. A *TMEM230* misszensz mutációját azonosították egy nagy észak-amerikai családban és két másikban, ahol egy-egy érintett személy volt (PARK21) [119]. Több tanulmányban azonban nem tudták igazolni, hogy a *TMEM230* mutáció jelenléte növelné a PD kialakulásának kockázatát [120, 121]. Ezen felül a nagy észak-amerikai család, amelyben a mutációt azonosították, ugyanaz a család, amelyben kimutatták a *DNAJC13*-t is (lásd. 1.6.1.1.7.). Ezért mind a *TMEM230*, mind a *DNAJC13* esetében kérdéses, hogy van-e szerepük a PD patomechanizmusában.

1.6.1.1.10 *UCHL1*

Az *UCHL1* (Ubiquitin C-terminal hydrolase L1) egy neuron-specifikus géncsalád egyik tagját kódolja, amely a poliubiquitin láncok monomerekké hidrolizálásával az ubiquitin újrahasonosítási útvonalban játszik szerepet. Ez kritikus jelentőségű az ubiquitin-proteaszóma rendszer és az idegsejtek túlélése szempontjából [122]. Az *UCHL1* jelenléte a LB-ben és szerepe a proteaszóma útvonalban arra utal, hogy szerepet játszhat a PD patogenezisében és egy jó kandidáns gén lehet [123]. Az *UCHL1* génben heterozigóta formában az I93M mutációt azonosították egy AD-PD-ben szenvedő német család érintett tagjainál (PARK5) [124]. Az in vitro analízis igazolta, hogy az *UCHL1* mutáns allélje

~50%-kal csökkent hidrolitikus aktivitást eredményez a vad típusú enzimhez viszonyítva [125, 126].

1.6.1.1.11 *GIGYF2*

Egy genom szintű kapcsoltsági elemzés 400 dinukleotid marker alkalmazásával késői kezdetű, AD-Parkinsonizmussal rendelkező testvérpár-mintáiban a 2q36-q37 kromoszómális régió kapcsolódását találta (PARK11) [127]. A legmagasabb kötődési pontszámmal rendelkező marker a *GIGYF2* (Grb10-Interacting GYF Protein-2) génrégióban volt [128]. A *GIGYF2* génrégió későbbi szekvenciaanalízise 12, egymással kapcsolatban nem álló, familiáris PD-ben szenvedő olasz és francia betegben hét különböző heterozigóta variánst azonosított a *GIGYF2* génben, ezek az eltérések hiányoztak a kontroll csoportban [129]. Ráadásul egy tanulmányban leírták, hogy a heterozigóta *GIGYF2* mutáns egereknél felnőttkori neurodegeneráció alakul ki, jelezve, hogy a *GIGYF2* gén diszfunkciója fontos szerepet játszhat a központi idegrendszer neurodegenerációs folyamataiban [130, 131]. Van azonban némi ellentmondás a *GIGYF2* gén PD patogenezisében játszott szerepével kapcsolatban, mivel számos tanulmány nem támasztotta alá a *GIGYF2* gén mutációi és a PD közötti kapcsolatot [132–134].

1.6.1.1.12 *HTRA2*

A *HTRA2/Omi* (High-temperature requirement A2) egy másik kandidáns PD gén, amely egy szerin-proteáz fehérjét kódol [2]. A heterozigóta *HTRA2* G399S misszensz mutációt először négy német PD betegnél azonosították (PARK13) [135]. Két további heterozigóta mutációt azonosítottak levodopa-reszponzív EOPD betegekben (átlag AOO: ~55 év) [136, 137]. Normál körülmények között a *HTRA2* gén által kódolt fehérje a mitochondriális intermembrán térben (IMS) helyezkedik el, és az IMS fehérjéinek minőségellenőrzésében vesz részt [138–140]. Az eddigi eredmények igazolhatják a kapcsolatot a *HTRA2* gén mutációi és a PD betegekben is igazolt, a neurodegenerációval nagyon gyakran együtt járó mitochondriális diszfunkció között [141].

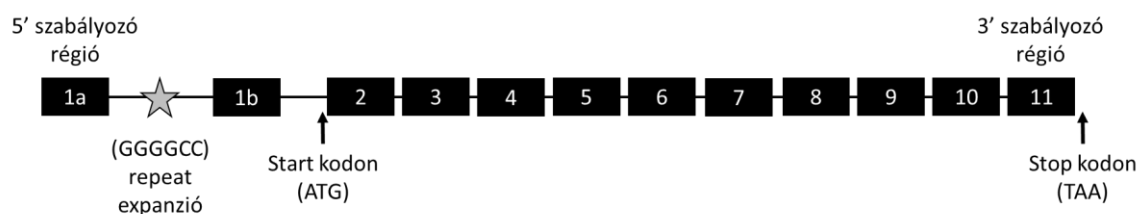
1.6.1.1.13 *CHCHD2*

A közelmúltban a mitochondriális diszfunkció szerepét a PD patogenezisében további bizonyítékokkal tudták alátámasztani. Ilyen például a teljes genom szekvenálással a *CHCHD2* (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain 2) génben azonosított heterozigóta mutációk jelenléte egy AD-PD érintett japán családban (PARK22) [142]. Ez a gén egy olyan fehérjét kódol, amely két sejtkompartmentben is aktív, a mitochondriumban és a

sejtmagban, és részt vesz a mitochondriális metabolizmus szabályozásában az oxigén jelenlététől függően [143]. Valószínűsíthető, hogy a *CHCHD2* gén mutációi a hipoxiás stressz során kialakuló neuroprotektív válaszokat gátolják a mitochondriális metabolizmus megzavarásával, ezáltal növelik a ROS szintet, és a Bax fehérjére hatva apoptózist indukálnak [2].

1.6.1.1.14 *C9orf72*

A *C9orf72* (chromosome 9 open reading frame 72) gén által kódolt fehérje a preszinaptikus végződéseken és a neuronok citoplazmatikus régiójában található [144]. Azonban pontos funkciója még jelenleg sem ismert teljes mértékben. Az egyik legelterjedtebb hipotézis szerint guanin-nukleotid kicserélő faktorként (GEF) vesz részt a Rab (Ras-associated binding) fehérjék szabályozásában, funkcióvesztése fokozza a lizoszómális fehérje-lebontást és az ubiquitinilált proteinek abnormális felhalmozódását [144]. A hasonló szerkezetű fehérjékkel a *C9orf72* gyakran összekapcsolódik, így egy nagyobb fehérjekomplex részeként a lizoszómákban látja el feladatát [145, 146]. A *C9orf72* esetén a legismertebb és legfontosabb klinikai jelentőséggel rendelkező eltérés a GGGGCC hexanukleotid ismétlődés feldúsulása, amely a gén 5' végén, introni régióban, a transzkripciót inicializáló ATG kodon előtt található (3. ábra). Feldúsulása haploinsufficienciához és a fehérje expressziójának csökkenéséhez vezet, valamint befolyásolja a prekursor mRNA átalakítását érett mRNA molekulává. Ezenkívül DNS és RNS hibridek alakulhatnak ki, amelyek további sejtmagi stresszt eredményezhetnek [147, 148]. A normál tartomány jelenleg 2-23 ismétlődés közé tehető, míg a több mint 30 ismétlődést már patogén mutációként tartják számon. A 23-30 közötti ismétlődés-szám esetén intermedier esetről beszélünk, amely pontos hatása még nem ismert [149].



3. ábra A *C9orf72* gén szerkezete

A csillaggal jelölt intronban következhet be a GGGGCC hexanukleotid repeat expansió.

Ma már több neurodegeneratív betegségben is azonosították, leggyakrabban ALS és FTD fenotípussal társul, de leírták már PD, AK és HD klinikai manifesztációval kapcsolatban is [150–152]. A *C9orf72* mutációinak a gyakorisága a különböző populációkban eltérő [153].

1.6.1.2 Autoszomális recesszív Parkinsonizmus háttérében álló gének

Az autoszomális recesszív Parkinsonizmus háttérében álló géneket a 2. táblázatban foglaljuk össze.

2. táblázat Autoszomális recesszív öröklésmentet mutató gének [2, 64, 68]

Rövidítésjegyzék: AOO: tünetek megjelenésének ideje, JO: juvenilis kezdetű, EO: korai kezdetű, LO: késői kezdetű, T: típusos, PARK2: autoszomális recesszíven öröklődő juvenilis Parkinson-kór-2, AT: atípusos, ALO: szemhéjnyitási apraxia, CA: cerebrális atrophia, SEMD: saccadicus szemmozgatósi zavar, PCA: progresszív cerebrális atrophia, SNGP: supranuclearis tekintés bénulás, CI: kognitív hanyatlás, RBD: REM alvási zavar, +: jó válasz, +/-: enyhe válasz, -: nincs válasz, DNL: dopaminerg neuron vesztés, LB:Lewy testek, N/A: nincs elérhető adat, LN: Lewy neuritok, SN: substantia nigra, Frek: frekvencia, SPD: sporadikus Parkinson-kór, FPD: familiáris Parkinson-kór,, Prog: progresszió, Het: heterozigóta eltérés, RF: rizikó faktor, SAC1: suppressor of actin 1, MRI: mágneses rezonancia képalkotás, MPAN: mitochondriális protein-asszociálta neurodegeneráció, AD: autoszomális domináns. További forrás: GeneReviews, OMIM.

Gén	AOO	Klinikai fenotípus	Nem-motoros tünetek	Levodopa válasz	Neuropatológia	Megjegyzés
PRKN	JO/EO	T alsó végtagi dystonia, dyskinesis, hyperreflexia, korai mozgászavarok	enyhe pszichiátriai tünetek lassú progressziója, CI és demencia nem jellemző	+ (alacsony dózis, dyskinesis)	DNL, nagyon kevés LB	Frek: SPD: 4,3% (EO 15%) FPD: 15,5% (EO 49%) Prog: lassú Het: talán RF
PINK1	JO/EO	T hasonlít PARK2-re	pszichiátriai tünetek gyakoribbak, mint PARK2-nél	+	LB, DNL	Frek: EO-SPD: 1,2%, EO-FPD: 4-5% Het: talán RF
PARK7	JO/EO	T hasonlít PARK2-re, korai aszimmetrikus dyskinesis, hyperreflexia, rohamok	szellemi fogyatékoság, több pszichiátriai tünet: pszichotikus zavarok, CI (ritka), szorongás, depresszió	+	LB, DNL	Frek: EO: 1% Het: kockázata ismeretlen

Gén	AOO	Klinikai fenotípus	Nem-motoros tünetek	Levodopa válasz	Neuropatológia	Megjegyzés
<i>VPS13C</i>	EO	AT pyramis jelek	CI, demencia, dysautonomia	+ (korai fázisban)	LB	Frek: ritka Prog: nagyon gyors Trunkáló variáns – súlyos fenotípus
<i>DNAJC6</i>	JO	AT pyramis jelek, hyperreflexia, rohamok	CI, demencia, hallucinációk	+	N/A	Frek: nagyon ritka Prog: gyors
<i>DNAJC6</i>	EO	T	-	+	N/A	Frek: ritka Prog: lassú Enyhébb hatású variánsok
<i>SYNJ1</i>	EO	AT néha generalizált rohamok, ALO	CI, demencia, epilepszia	-	N/A	Frek: ritka SAC1-like domén variánsai: JO dystonia dyskinesissel
<i>PLA2G6</i>	JO/EO (10-30 év)	AT dystonia, ataxia, CA, látási zavarok, pyramis jelek, korai motoros komplikációk	gyors CI, demencia, pszichiátriai tünetek: depresszió, agresszivitás, ingerlékenység, dysautonomia	+ (korai szakasz, dyskinesis)	LB, LN	Frek: ritka (<1%) Prog: gyors, súlyos agyi MRI: globális/frontális corticalis atrophia, néhány
<i>FBX07</i>	JO/EO	AT/T hyperreflexia, SEMD, pyramis jelek, motoros komplikációk, corticospinális tünetek	CI, pszichiátriai tünetek, RBD, depresszió, szorongás	+ (dyskinesis)	N/A	Frek: ritka (<1%) Prog: gyors

Gén	AOO	Klinikai fenotípus	Nem-motoros tünetek	Levodopa válasz	Neuropatológia	Megjegyzés
<i>ATP13A2</i>	JO/EO	AT PCA, dystonia, SNGP, spasticitás, pyramis jelek, korai motoros komplikációk	CI, demencia, depresszió	+	N/A	Frek: ritka (<1%) Széles variabilitás. Kufor-Rakeb szindróma
<i>SPG11</i>	JO	AT pyramis jelek	CI, demencia	+/- (súlyos mellék- hatások)	N/A	Agyi képalkotás: corpus callosum/globális agyi atrophia
<i>PODXL</i>	JO	T/AT dyskinesia, off- dystonia, corticospinalis jelek (hyperreflexia), spasticitás, rohamok, szemmozgás-zavarok	korai CI	+	N/A	1 közölt család, további megerősítésre van szükség a kapcsolódó kockázat tisztázásához
<i>PTRHD1</i>	EO	AT pyramis jelek, dystonia, SEMD	hypersomnia, mentális hanyatlás (gyermekkor), pszichiátriai tünetek: szorongás, hypersexualitás, nyugtalanág	+	N/A	További megerősítésre van szükség a kapcsolódó kockázat tisztázásához

Gén	AOO	Klinikai fenotípus	Nem-motoros tünetek	Levodopa válasz	Neuropatológia	Megjegyzés
<i>SLC6A3</i>	JO	AT cerebellaris bénulás, hyper-, hypo-, dyskinesis, dystonia, chorea, axialis hypotonia, pyramis jelek, szemmozgás- zavarok	A kognitív funkciók látszólag kevésbé sérültek, de a legtöbb beteg a tizenéves korában exitál.	N/A	N/A	Frek: ritka
<i>C19orf12</i>	JO/EO	AT extrapyramis és pyramis jelek, ataxia, progresszív spasticus paraplegia, dystonia, dysarthria	CI, demencia, depresszió,	-	LB, vas felhalmozódás (globus pallidus+SN)	Frek: ritka MPAN De novo heterozigóta eltérés a 3. exonban AD öröklésmenet.
<i>POLG</i>	JO/EO/LO	AT ataxia, Romberg jel, ptosis, hyporeflexia, neuropathia	depresszió, érzelmi instabilitás	+	DNL, nincs LB	Frek: ritka Ritkán AD öröklésmenet. Nagyon változatos fenotípus

1.6.1.2.1 *PRKN*

A *PRKN* génben 1998-as klónozása óta több, mint 100 különböző mutációt írtak le, amelyek lehetnek homozigóta vagy összetett heterozigóta pontmutációk vagy deléciók és duplikációk is [72, 154]. A *PRKN* gén mutációja egy autoszomális recesszív, korai vagy juvenilis kezdetű PD-t okoz (PARK2) [2]. Minél később jelennek meg a tünetek, annál kisebb az esélye, hogy *PRKN* gén mutációja áll a betegség háttérben [155]. Érdekesség, hogy homozigóta vagy összetett heterozigóta *PRKN* mutációt hordozó egyének 81%-ában a tünetek 20 éves kor előtt jelennek meg. [156–158]. Ezenkívül a *PRKN* génben az egyes heterozigóta szubsztitúciókat sporadikus, késői indulású PD-ben is leírták [72], bár ezeknek a heterozigóta eltéréseknek a kóroki jelentősége még mindig vitatott. A specifikus *PRKN* mutációk gyakorisága és penetranciája nemzetiségenként eltérő. A *PRKN* mutációs gyakorisága hasonló a kaukázusi (7,7%) és az ázsiai (10,5%) népcsoportok között, de szignifikánsan alacsonyabb a latin-amerikai népcsoportoknál [159]. Az azonosított mutációk kb 50%-a pontmutáció, a maradék pedig nagyobb deléció vagy duplikáció következménye [160]. Különösen érdekes, hogy a legtöbb *PRKN* mutációt hordozó személynek van exoni átrendeződése heterozigóta állapotban [161]. A *PRKN* exon deléciói/duplikációi általában de novo eredetűek, míg a közös európai alapító hatások látszólag magyarázzák az Európában és az Egyesült Államokban felfedezett misszensz mutációkat [162]. A *PRKN* kópiaszám eltérései (CNV) valószínűleg károsabbak, mint a pontmutációk [163].

A *PRKN* génben azonosított mutációk a substantia nigra dopaminerg neuronjainak pusztulásával asszociálnak [164]. Funkcionálisan a *PRKN* által kódolt parkin fehérje az E3 ubiquitin ligáz komplex tagja, amely az aktivált ubiquitin molekulát kapcsolja a kijelölt fehérjéhez [165]. A parkin mediálta ubiquitinilációnak számos funkcionális következménye van, többek között a hibásan feltekeredett vagy sérült fehérjéket a proteaszómális lebontási útvonalra tereli [166]. A LB-ben azonosított fehérje inklúziók a PD betegekben arra engednek következtetni, hogy a parkin fehérje E3 ubiquitin ligáz funkciójában bekövetkező zavara sérült és mutáns fehérjék felhalmozódásához és végül az idegsejtek pusztulásához vezet [165]. A parkin fehérje a mitochondriális minőségellenőrzést is kontrollálja, így hibás parkin fehérje jelenlétében sérül a sejt képessége, hogy szelektív lizozóma-függő lebontáson keresztül eltávolítsa a diszfunkcionális, sérült mitochondriumokat (ez a folyamat a mitofágia) [54, 167].

1.6.1.2.2 *PINK1*

A *PINK1* (PTEN-induced kinase) gén az AR EOPD második leggyakoribb oka [168, 169]. A *PINK1* génben több mint 40 különböző mutációt írtak már le homozigóta vagy összetett heterozigóta formában [170]. Azokban az esetekben, ahol homozigóta vagy összetett heterozigóta mutáció igazolódik a *PINK1* génben a *PRKN*-hez képest kicsit későbbi életkorban, de általában 40 éves kor előtt jelentkeznek az első tünetek (átlagos AOO: 32 év) és a betegség átlagos lefolyása hosszabb [171]. A *PINK1* patogén, ritka variánsok előfordulási gyakorisága nagyon változó, populációnként is eltérő (1-15%) [172].

A megnyilvánuló PD fenotípus nagyon hasonló a *PRKN*-vel (*PARK6*) és a *PINK1*-vel érintett páciensek között, mely arra utal, hogy azonos útvonalon hatnak a PD patomechanizmusában [171]. A *PINK1* gén egy olyan mitochondriális szerin/treonin kinázt kódol, amely fontos szerepet játszik a mitochondriális forgalomban, dinamikában és minőségellenőrzésben, valamint a mitofágiában [173, 174]. Összességében a gén által kódolt enzim védi a sejteket az oxidatív stressz okozta programozott sejthaláltól, így a gén mutációja a dopaminerg sejtek apoptózisához vezet. Bizonyos mutációk a *PINK1* fehérje stabilitását, míg mások a kináz aktivitást csökkentik, támogatva a hipotézist miszerint a mitochondriális diszfunkció és az oxidatív stressz egyaránt kapcsolódik a PD-hez [175, 176].

1.6.1.2.3 *PARK7*

Ismert, hogy a *PARK7/DJI* (Parkinsonism associated deglycase) génben bekövetkező mutációk nagyon ritkák és szintén fiatalkori kezdetű PD-t okoznak (átlag AOO: 27 év). [177]. A tünetek hasonlítanak a *PRKN* és *PINK1* gének mutációja által okozott fenotípushoz (*PARK7*). A *PARK7* által kódolt fehérje szerepet játszik a transzkripcionális szabályozásban és az antioxidatív stressz reakciókban az idegsejteken belül [178]. Tehát a citoprotektív útvonalakon keresztül az oxidatív stressz és a mutációk elkerülésében játszik szerepet, ezáltal megelőzve az idegsejtek progresszív apoptotikus pusztulását, amely folyamat sérülése végül a PD tünetek korai kialakulásához vezethet.

1.6.1.2.4 *VPS13C*

A közelmúltban a Parkinsonizmus kapcsán végzett teljes genom vizsgálatok kimutatták, hogy a *VPS13C* (vacuolar protein sorting 13C) fehérje mutációi kapcsolódnak az AR EOPD formák kialakulásához (*PARK23*). A *VPS13C* a vacuolar protein sorting 13

fehérjecsald egyik tagját kódolja, amely valószínűleg a külső mitochondriális membránon helyezkedik el.[179]. Valószínűsíthető, hogy a *VPS13C* együttműködik a *PRKN/PINK1* útvonallal és hozzájárul a sérült mitochondriumok lizozómába történő szelektív szállításához. Összességében elképzelhető, hogy a *VPS13C* gén mutációi megnövekedett ROS szintet és diszfunkcionális mitochondriumokat eredményezhetnek, és végül neuronális sejthalálhoz vezethetnek [180, 181].

1.6.1.2.5 *DNAJC6*

A *DNAJC6* (DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6) gén mutációi az ARJO atípusos Parkinsonizmushoz (PARK19/A) köthetők [2]. A *DNAJC6* gén az agyspecifikus auxilin nevű fehérjét kódolja, amely egy feltételezett tirozin-protein foszfatáz enzim, amely szerepet játszik a klatrin-burkolt vezikulák preszinaptikus endocitózisában és a szinaptikus vezikulák reciklizációjában [182]. Az útvonal károsodása befolyásolja az új vezikulák képződését a preszinaptikus végződésnél [183]. Eltérő fenotípusokat figyeltek meg olyan PD betegekben, akik homozigóta *DNAJC6* mutációkat hordoztak. Ezek az eltérések egyértelműen elkülönítik a betegek ezen csoportját a PARK19/A-tól, azt sugallva, hogy bizonyos kevésbé káros eltérések a *DNAJC6* génben kisebb mértékben csökkentik az auxilin expressziót, ezáltal enyhébb fenotípusú EOPD-t okoznak (PARK19/B) [182].

1.6.1.2.6 *SYNJ1*

A *SYNJ1* gén mutációi ARJO atípusos Parkinsonizmust okoznak (PARK20) [2]. A *SYNJ1* gén a synaptojanin-1 fehérjét, egy preszinaptikus foszfoinozítid foszfatáz enzimet kódol, amely szerepet játszik a szinaptikus vezikulák endocitózisának szabályozásában, és fontos az így felvett fehérjék újrahasznosításában. Az endocitotikus újrahasznosítási útvonal károsodása a fehérjék felhalmozódásához vezet a szinaptikus végzésekben, és ez eredményezheti a dopaminerg axon terminálisok szelektív disztrophiaját a dorsalis striatumban. Az állatkísérletek során talált emelkedett auxilin és parkin fehérje szint arra utal, hogy a megfigyelt kölcsönhatás más PD-asszociált génekkel egy újabb potenciális patológiai mechanizmust jelezhet [184].

1.6.1.2.7 *PLA2G6*

A *PLA2G6* (Phospholipase A2 group 6) gént különféle neurodegeneratív betegségek hátterében írták le, beleértve az infantilis neuroaxonális disztrophiát (INAD), az agyi vas felhalmozódással járó neurodegeneratív betegséget (NBIA) és a Karak-szindrómát [185].

Ugyanakkor az indiai, iráni és pakisztáni családok nemrégiben végzett genetikai elemzése során leírták, hogy a *PLA2G6* gén homozigóta vagy összetett heterozigóta misszensz mutációi felelősek az AR-EO dystonia-Parkinsonizmusért (PARK14) [36]. Az érintett betegeknél a klinikai fenotípus komplex, az LB-k ritkán azonosíthatók a SN-ben, és több kortikális és limbikus tünettől rendelkeznek, mint az iPD betegek [21].

A *PLA2G6* gén egy kalciumfüggetlen foszfolipáz enzimet kódol, amely hidrolizálja a membrán glicerofoszfolipidek sn-2 észterkötését, ezáltal szabad zsírsavakat és 2-lizofoszfolipideket hoz létre [186]. Ez a funkció nagymértékben befolyásolja a sejtes és sejten belüli membrán foszfolipidek oxidatív károsodásainak javítását, a membrán fluiditást, valamint a membrán permeabilitás és a vas homeosztázis fenntartását [186, 187]. A *PLA2G6* katalitikus aktivitásának elvesztését okozó mutációk INAD/NBIA2-höz vezetnek, míg a PARK14-et eredményező mutációk megváltoztathatják a szubsztrát preferenciáját vagy a szabályozási mechanizmusokat [188]. A *PLA2G6* gén mutációi okozta dopaminerg idegrendszer károsodás és agyi vas felhalmozódás a sporadikus és a familiáris PD hátterében álló patogén mechanizmusnak tekinthető [189].

1.6.1.2.8 *FBXO7*

Az *FBXO7*-et (F-box protein 7) 2008-ban új PD-kapcsolt génként azonosították egy EOPD-vel érintett nagy iráni családban (PARK15) [190]. A gyermekkorban kezdődő kombinált extrapyramidalis-pyramidalis-szindrómát kezdetben dystonia jellemezte, amely bizonyos esetekben levodopa-reszponzív akinetikus-rigid Parkinsonizmussal progresszívult. Cerebellaris tünetek és demencia nem fordult elő és az MRI sem mutatott kóros eltérést [190]. Olasz és holland családokban is azonosítottak homozigóta és összetett heterozigóta funkcióvesztéses mutációkat az *FBXO7* génben [191]. Olyan eseteket is írtak le, ahol a serdülőkorban kialakuló atípusos Parkinsonizmussal társult [192, 193], majd a típusos iPD-vel kompatibilis fenotípust is azonosítottak [194]. Az α -synuclein-pozitív zárványok nagy részében jelen van az *FBXO7* által kódolt fehérje PD és MSA esetekben, és alkalmanként azonosítható tau-pozitív zárványokban AK és PSP esetében, ami arra utal, hogy az *FBXO7* szerepet játszik a synucleinopathiak patogenezisében [195].

A pontos mechanizmus, amellyel az *FBXO7* hozzájárul a neurodegenerációs folyamathoz jelenleg még kevésbé ismert. Bebizonyosodott, hogy az *FBXO7* molekuláris állványként működik az ubiquitin-ligáz komplexek képződésében és szerepet játszik az ubiquitin-

proteaszóma rendszer működésében [196]. A fentiek alapján feltételezzük, hogy az *FBXO7* a *PRKN/PINK1*-vel közös úton működik, a sérült mitochondriumok mitofágiával történő eltakarításában, és az *FBXO7* patogén mutációi ezt az útvonalat zavarhatják meg [197–199].

1.6.1.2.9 *ATP13A2*

Eredetileg az *ATP13A2* (ATPase type 13A2) gén a Kufor – Rakeb szindrómával (KRS) kapcsolatban írták le, amely egy súlyos AR-EOPD (PARK9) [2]. Az *ATP13A2* gén az ATPáz 5P típusú aloszaládjába tartozik és egy lizoszómális transzmembrán fehérjét kódol, amely főként az agyban expresszálódik. Az *ATP13A2* gén funkcióvesztéses mutációi lizoszómális membrán instabilitáshoz és később a lizoszómális proteolízis károsodásához vezetnek, amelyek megfelelő működése viszont elengedhetetlen a lizoszóma-mediált megfelelő fehérje- és mitochondriális mennyiség- és minőség-ellenőrzési útvonalakhoz az idegsejteken belül [200–202]. Ezeket a hibákat szorosan összekapcsolják az α -synuclein kóros felhalmozódásával és a mitochondriális diszfunkcióval, ami csökkent ATP-termelést és megnövekedett intracelluláris ROS-szintet eredményez, amely hozzájárul az idegsejtek pusztulásához [203–205]. Ezen túlmenően számos vizsgálat kimutatta a mangán és a cink abnormális felhalmozódását az *ATP13A2* mutációkkal érintett PD-betegek agyában és cerebrospinális folyadékában [206–208]. Valószínű, hogy az *ATP13A2* megvédi a sejteket a fémtoxicitástól azáltal, hogy a PD szignifikáns környezeti kockázati tényezőinek számító mangán és a cink homeosztázisát biztosítja az idegsejteken belül [209–211] [21].

1.6.1.2.10 *SPG11*

Az *SPG11* gén a spatacsin fehérjét kódolja, amely szerepet játszik az idegsejtek axonális növekedésében, működésében és az intracelluláris anyagforgalomban [212]. Az *SPG11* gén mutációi több különböző betegség kialakításában vesznek részt: a spastikus paraplegia 11-ben, a juvenilis amyotrophias lateralis sclerosis 5-ben és az axonális Charcot-Marie-Tooth 2X típusban. Az *SPG11* felelős bizonyos atípusos EOPD formákért is [192, 213]. Jelentős átfedés mutatkozik ezen betegségek között, amely nehezíti a klinikai diagnózis felállítását.

1.6.1.2.11 *PODXL*

A *PODXL* (podocalyxin-like protein) egy glikoproteint kódol, amely részt vesz a neurit növekedésének szabályozásában. Eddig egyetlen, juvenilis dopa-reszponzív PD-ben

szenvedő három érintett taggal rendelkező családról számoltak be (PARK2), ahol a *PODXL* homozigóta frameshift mutációját igazolták, ami a protein funkció teljes elvesztéséhez vezet [214]. A *PODXL* mint PD kóroki gén megerősítéséhez fontos lenne további érintett családokat is azonosítani.

1.6.1.2.12 *PTRHDI*

A *PTRHDI* (peptidyl-trna hydrolase domain-containing 1) gént eddig két iráni családban írták le, az elsőben egy homozigóta misszensz mutációt (H53Y), míg a másikban a C52Y eltérést azonosították [64]. A *PTRHDI* gén által kódolt fehérje PTH2 domént tartalmaz, ami arra utal, hogy az ubiquitin-proteaszóma útvonalon működik [215].

1.6.1.2.13 *SLC6A3*

Az infantilis parkinsonizmus-dystonia-1 (PKDYS1), más néven dopamin transzporter hiányos szindróma (DTDS), egy komplex motoros neurológiai rendellenesség, amely csecsemőkorban kezdődik. A *SLC6A3* (solute carrier family 6 member 3) gén által kódolt preszinaptikus DAT funkciójának elvesztése okozza [216, 217]. A DA hibás visszavétele a DA felhalmozódását eredményezi a szinaptikus résben, amely lebomlik, és megnöveli a cerebrospinális folyadék (CSF) homovanillinsav (HVA) szintjét. Továbbá a preszinaptikus aktivitáshoz szükséges DA preszinaptikus kimerülését eredményezi. Az extraneuronális DA felesleg csökkenti a DA termelést és a DA receptorok alulszabályozását vagy deszenzitizációját eredményezheti, ezáltal utánozva a DA hiányt [218]. A pakisztáni populációban 11 gyermeket jelentettek, akiknél genetikailag igazolt PKDYS1 volt azonosítható (AOO: 0,5–7 hónap) [216, 218] és további két mennonit nővérről számoltak be hasonló tünetekkel [217].

1.6.1.2.14 *C19orf12*

A *C19orf12* (chromosome 19 open reading frame 12) gén egy mitochondriális fehérjét kódol. Mutációi a mitochondriális membránfehérje-asszociált neurodegenerációt (MPAN) okozzák, amely az agyi vas felhalmozódással járó neurodegeneratív (NBIA) betegségek csoportjába tartozik. Ezek általában extrapiramidális szindrómaként manifesztálódnak, jellegzetes vas felhalmozódással a globus pallidus és a basalis ganglionok területén. Az MPAN esetében szembetűnő a demenciáig tartó kognitív hanyatlás, a neuropszichiátriai rendellenességek, a motoros neuropathia és a korai felső motoneuron tünetek, amelyeket később alsó motoneuron diszfunkciók és korai opticus atrophia követ. Felnőttkorban Parkinsonizmus és dystonia is előfordulhat [21].

1.6.1.2.15 *POLG*

A *POLG* (DNA polymerase gamma, catalytic subunit) által kódolt mitochondriális DNS polimeráz γ (polg) fehérje felelős a mitochondriális DNS (mtDNS) replikációjáért. A fehérje hibás működése miatt másodlagos mutációk jelenhetnek meg a mtDNS szekvenciájában [219]. A kialakuló mtDNS deléciók és pont mutációk, illetve a mtDNS depléciója különböző súlyosságú mitochondriális betegségekkel mutatnak összefüggést és az öregedés során is megfigyelhetők. [220]. A mitochondriális légzési lánc kémiai gátlása a dopaminerg neuronok pusztulásához és így Parkinsonizmus kialakulásához vezethet [221]. A dopaminerg neuronokban kimutathatóan magasabb a mitochondriális DNS mutációs rátája, ezt pedig a polg fehérje hibás működése is okozhatja [222].

Jelenleg körülbelül 300 olyan eltérés ismert a *POLG* génben, amelyet különböző betegségekhez tudtak kapcsolni (Human DNA Polymerase Gamma Mutation Database) [223]. A mitochondriális betegségek a fenotípus, az öröklésmenet és a tünetek megjelenésének időpontja szempontjából is nagyon változatosak. A legtöbb esetben az azonosított *POLG* mutációk összetett heterozigóta vagy homozigóta misszensz szubsztitúciók, melyek közül egyesek már heterozigóta formában is bizonyos neurodegeneratív betegségekkel összefüggésbe hozhatók, mint a progresszív externális ophthalmoplegia (PEO). Az alap fenotípus sokszor kiegészülhet egyéb tünetekkel, mint például a myoclonus, az epilepszia, a myopathia, a sensoros ataxia, a Parkinsonizmus, a kognitív hanyatlás és az infertilitás [223].

Egyes esetekben a heterozigóta mutációk szubklinikai vagy enyhébb fenotípussal és későbbi indulással manifesztálódhatnak [224]. Számos, korábban közölt *POLG* eltérést azonosítottak a Parkinsonizmus tüneteit mutató betegekben akár PEO-val vagy anélkül (P587L, R722H, G737R, W748S, Y831C, R853W, E856K, R993C, E1143G, S1230F, Q1236H) [225]. Számos közlemény leírta, hogy a *POLG* eltéréssel rendelkező betegeknél súlyos és progresszív dopaminerg neuron pusztulás detektálható a substantia nigra területén [219, 225–227]. Összefoglalva a *POLG* génben bekövetkező változások fontos szerepet játszhatnak a különböző örökletes neurodegeneratív betegségek, így a monogénes Parkinsonizmus kialakulásában is, de még nincs kellően erős evidencia a *POLG* és a PD kapcsolatára.

1.6.2 A Parkinson-kórra hajlamosító genetikai faktorok

A PD ismert monogénes okai mellett (1. táblázat, 2. táblázat) további géneket és hajlamosító lokuszokat azonosítottak genomra kiterjedő asszociációs tanulmányok (GWAS) és más kutatások során. A genetikai módosító tényezők befolyásolhatják a PD életkorral összefüggő kockázatát vagy a PD klinikai képét, például a tünetek megjelenésének idejét, valamint a motoros és nem motoros tünetek progresszióját [228]. Annak érdekében, hogy feltárják azt a genetikai architektúrát, amely sporadikus esetekben befolyásolja a betegség iránti fogékonyságot, az elmúlt két évtizedben több mint 800 GWAS-t végeztek a Parkinsonizmus területén, ám a vizsgálatok többsége inkonzisztens eredményt adott. A probléma enyhítése érdekében a közelmúltban sikeresen kifejlesztették a GWAS metaanalízis szisztematikus megközelítését a komplex betegségek, úgy mint a neurodegeneratív betegségek, genetikai asszociációs eredményeinek értelmezésére [52, 229].

Eddig is már több mint 40 PD-vel összefüggésben lévő kockáztnövelő faktort azonosítottak és validáltak [56]. Ezek közül számos gén megtalálható monogénes PD-t okozó faktorok között is (*SNCA* és *LRRK2*). Például az ázsiai populációk esetében az *LRRK2* génben azonosítható G2385R variáns a PD általános kockázati tényezője (a variánst hordozó egyén fokozott kockázattal rendelkezik a PD-re, OR: 2,24), különösen a kínai populációkban [84, 230]. Ezen kívül az ázsiai népességben egy másik gyakori kockázati tényező az S1647T aminosavcsere szintén az *LRRK2* génben, amely homozigóta formában 1,2-szeresére növeli a betegség kialakulásának esélyét [231]. Jelenlegi ismereteink szerint a leggyakoribb erős kockázati tényező a *GBA* [232] (lásd. 1.6.2.1. fejezet). Viszont vannak olyan hajlamosító gének is, amelyeknél ismert, hogy nem "okoznak" ténylegesen PD-t, csupán a kialakulás kockázatát növelik. Ezért az ilyen géneket nem, vagy csak nagyon körültekintően szabad bevonni a diagnosztikai tesztekbe. A vizsgált PD esetek között vannak olyanok, amelyek esetében csak heterozigóta mutációkat azonosítottak AR-PD génekben (pl. *PRKN*). Azonban az ilyen esetekhez tartozó betegségkockázattal és –mechanizmussal kapcsolatban továbbra is sok kérdés maradt tisztázatlan. Sharp és munkatársai számos magyarázatot javasoltak az LB-k előfordulására az egyetlen heterozigóta mutációt hordozókban, akik késői kezdetű PD-ben szenvednek: (1) ezekben a késői indulású betegekben az LB-k életkorhoz kapcsolódók és esetlegesek, (2) a késői indulású betegekben hiányozhatnak a fehérje

felhalmozódás eltakarítására szolgáló mechanizmusok, és (3) ezekben a késői indulású esetekben a mutációk következtében a parkin csak részlegesen veszíti el az E3 ubiquitin ligáz funkcióját, pl. a heterozigóta R275W mutációt reziduális ligáz aktivitással társították [233]. A *PRKN*-hez hasonlóan a heterozigóta *PINK1* mutációk szerepe is ellentmondásos [234]. A *PINK1* mutációk széles körű szűrése a PD agybankból származó mintákban négy heterozigóta eltérést azonosított (A339T, Y431H, N451S és C575R) sporadikus betegekben [235]. A klinikai és a patológiai fenotípus is összeegyeztethető volt a PD diagnózisával, amelyet pszichiátriai tünetek kísértek. Két esetben kognitív hanyatlást igazoltak (közülük az egyiknél AK patológia is jelen volt). A PD patológia típusos volt mind a négy betegnél, agytörzsi és agykérgi LB-k jelenlétét, SNpc idegsejt pusztulását és neurofibrilláris kötegeket (I-V stádiumok) azonosítottak [235]. Mivel a legtöbb esetben a genetikai módosító tényezők csak kis mértékben járulnak hozzá a PD kockázatához [236], a nagyrésze még nem alkalmazható klinikailag, és további kutatásokra van szükség a klinikai diagnózisban és a kockázatbecslésben betöltött szerepük tisztázása érdekében.

Tekintettel arra, hogy a különféle neurológiai rendellenességek átfedő klinikai tulajdonságokkal manifesztálódnak, ezért a PD eddig azonosított rizikó tényezői mellett egyre nagyobb számban írnak le olyan géneket a PD fenotípusával összefüggésben, amelyeket korábban más neurodegeneratív betegséggel asszociáltak. Noha a genetikai adatok hozzájárulnak a rendellenességek értelmezéséhez, még ennek a megközelítésnek is vannak hiányosságai, mivel ugyanazon gén mutációi néha különböző klinikai diagnózissal társulnak.

1.6.2.1 GBA

Számos tanulmányban találtak Gaucher-kórban (GD), vagyis egy lizoszómális tárolási rendellenességben szenvedő betegeknél Parkinsonizmust, amelyet a *GBA* (Glucocerebrosidase) gén mutációi okoztak [237]. Ezenkívül néhány GD-vel érintett családban a proband több rokonánál kialakult a Parkinsonizmus, akik közül sokak obligát heterozigóta *GBA* variánst hordoztak. Ez arra utalt, hogy bizonyos *GBA* variánsok a Parkinsonizmus kockázati tényezői lehettek ezekben a családokban [238, 239].

Eddig több mint 300 mutációt írtak le a *GBA* génben [240]. Klinikai szempontból azokat a betegeket, akik heterozigóta *GBA* variánst hordoznak nem lehet megkülönböztetni az iPD fenotípust mutató páciensektől. Előfordulhat azonban, hogy korábban jelennek meg

a tünetek és gyakrabban társul kognitív hanyatlással, valamint ritkábban reagálnak a levodopa kezelésre [241, 242]. A gyakori kognitív rendellenességek mellett sok esetben az érintett betegeknél különböző hallucinációk is megjelennek. A tünetek esetében súlyos progresszió figyelhető meg és később aszimmetrikus tremor, rigiditás, bradykinesis és posturalis instabilitás is jelentkezhet. A *GBA* klasszifikálása jelenleg is vita tárgyát képezi, az életkorhoz kapcsolódó alacsony penetrancia miatt egyrészt monogénis kóroki tényezőként, másrészt kockázati faktorként is szerepet játszhat a PD kialakulásában. A penetrancia életkor, variáns és etnikum függő. Ugyanakkor néhány *GBA*-variáns becsült penetranciája megközelíti a *LRRK2* variánsokét [243, 244]. Például a N409S *GBA* variáns becsült penetranciája 6–14% minden populációban [243]. A legfrissebb tanulmányok szerint a homozigóta vagy heterozigóta *GBA* mutációk 20–30-szorosára növelik a PD kockázatát, és a PD-betegek 5–10%-ánál azonosítható kóroki variáns a *GBA* génben [245]. Összefoglalva elmondható, hogy jelenleg a *GBA* gén heterozigóta mutációit a PD kialakulásának egyik legfontosabb genetikai kockázati tényezőjeként tartják számon [246–248]. Mivel már heterozigóta formában is okozhat tüneteket, ezért manapság inkább már az AD-PD-vel asszociáló gének közé sorolják.

A *GBA* és a PD kapcsolatát neuropatológiai vizsgálatok is alátámasztották, amelyek kimutatták a dopaminerg neuronális diszfunkciót az α -synuclein és a LB széles körű megjelenésével homozigóta és heterozigóta *GBA* mutációkat hordozó betegeknél [249]. Ezenkívül a biokémiai vizsgálatok is igazolták, hogy a glukocerebrozidáz enzim (GCáz) aktivitása szignifikánsan csökken, és az α -synuclein felhalmozódása is fokozódik a *GBA* mutációt hordozó PD betegek agyában. A GCáz alacsony enzimaktivitása csökkent lizoszómális fehérje lebontáshoz, és az α -synuclein fokozott exoszómális felszabadulásához és toxikus aggregátumok képződéséhez vezethet [250–253].

1.7 A Parkinson-kór környezeti kockázati tényezői

Az egyik legfontosabb nem genetikai tényező, amely hozzájárul a PD kockázatához az életkor. Az epidemiológiai vizsgálatok kimutatták a PD lehetséges összefüggését a környezeti tényezőkkel, beleértve a peszticid kitettséget, a fej sérülését, a vidéki életet és a fertőző kórokozókat. Az alacsonyabb PD kockázattal összefüggő környezeti tényezők a dohányzás, a koffein fogyasztása, a nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (NSAID) használata, a magas vér húgysav szint és a fizikai aktivitás [60, 254]. Az életkor

mellett számtalan tanulmány talált bizonyítékot arra, hogy a nem is befolyásoló tényező a betegség prevalenciájára. Igazolták, hogy a PD sokkal gyakoribb a férfiakban, mint a nőkben, ez az arány 3:1, amely valószínűleg az ösztrogén dopaminerg idegsejtekre és agyi úton történő hatására vezethető vissza [255].

A dopaminerg neuronok normál működéséhez elengedhetetlen a szinaptikus résekből a DAT-on keresztüli dopamin újrafelvétel a preszinaptikus neuronokba [256]. Számos drog használata (pl. a kokain) fokozza a dopamin extracelluláris szintjének emelkedését, ami eufórikus hatásokat és motoros tüneteket eredményez [257].

A PD esetében vannak olyan bizonyítékok, amelyek szerint a DAT diszregulációja is a betegség mechanizmusának faktora [258]. A kokain fokozza a dopaminerg jelátvitelt, mivel kötődik a DAT-hoz, és megakadályozza a dopamin újbóli felvételét a szinaptikus résekből [259]. A kokain-függőség és a növekvő PD-kockázat közötti feltételezett összefüggést korábban már több betegnél leírták [260], bár számos esetben a kokain fogyasztás ellenére nem figyeltek meg korrelációt a PD-vel [261].

Noha a kokainhasználók körében a PD magasabb kockázatának bizonyítéka vitatott, már bebizonyosodott, hogy az agy szerkezete megváltozik, és az α -synuclein konformációja kompaktabbá válik [262]. A PD patogenezisében a hibásan feltekeredett α -synuclein döntő szerepet játszik a dopaminerg neuronok pusztulásában, tehát a PD progressziójában [263]. A kokain-függőkben az α -synuclein túlzott expresszióját írták le a dopaminerg neuronokban, potenciálisan növelve a dopaminerg neuronok degeneratív változásainak kockázatát [264].

Összességében, figyelembe véve a PD genetikailag heterogén jellegét, a sporadikus és a familiáris PD genetikai architektúrájának tisztázása javítja a diagnosztikai pontossági rátákat (érzékenység és specifitás), és következésképpen lehetővé teszi a veszélyeztetett egyének preszimptomás diagnosztizálását, valamint esetleges prenatális tesztelést az érintett családokban. Ezenkívül kiterjesztheti ismereteinket a betegség genetikai és neuropatológiai mechanizmusairól, amelyek kiemelkedően fontosak lehetnek a terápiák kidolgozásában. Végül javítja annak a lehetőségét, hogy a különféle PD betegeket genetikai altípusokba soroljuk. Ez a betegek genetikai etiológiáján és a háttérben álló molekuláris mechanizmusokon alapuló osztályozás a betegség lefolyásába történő hatékony beavatkozás révén elősegítheti az érintettek hatékony kezelését.

2 Célkitűzések

A PD monogénes formái viszonylag ritkán fordulnak elő még a magas heritabilitás ellenére is, és etiológiája további tisztázásra szorul. Az elmúlt években az NGS elterjedése lehetővé tette további gének azonosítását a PD patogenezis hátterében. Az NGS adatok értelmezése során a ritka vagy nem teljes mértékben igazolt, PD-asszociált gének elemzése, új biológiai betekintést nyújthat a betegség komplex genetikai etiológiájába, továbbá bizonyos esetekben új terápiás célpontok is azonosíthatók. Tanulmányunk célja volt a korai kezdetű Parkinsonizmus genetikai hátterének feltárása és megértése a magyar populációban a jól ismert PD-asszociált gének vizsgálatával, valamint új vagy ritka genetikai eltérések azonosítása nagy teljesítményű NGS technológiával. Elsőként elemeztük NGS segítségével a Parkinsonizmussal diagnosztizált magyar betegeket.

Az értekezésben bemutatott Parkinsonizmus genetikáját vizsgáló tudományos munka célkitűzéseit a következőképpen foglalhatjuk össze:

1. A Parkinsonizmus genetikai hátterének vizsgálata magyar populációban. A heritabilitás hátterében álló öröklésmódok tisztázása, a PD genetikai diagnosztikája során alkalmazandó algoritmus kidolgozása.
2. A Parkinsonizmussal összefüggésben álló genetikai elváltozások jelenlétének és előfordulási gyakoriságának vizsgálata magyar betegeknél.
3. A talált genetikai architektúra és a fenotípus korrelációjának vizsgálata. Ennek segítségével a genetikai tanácsadás számára útmutatás kidolgozása a genetikai eredmények közzléséhez, a gén-környezet interakció értelmezéséhez.
4. A Parkinsonizmusban szenvedő páciensek regiszterének és biológiai mintagyűjteményének kialakítása, *trial-ready* kohort létrehozása annak érdekében, hogy genetikailag stratifikált betegeink számára a klinikai vizsgálatokban való részvételt minél nagyobb valószínűséggel tudjuk biztosítani.

3 Módszerek

3.1 A vizsgált betegek

A Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében 2018 végéig összesen 282 PD iránydiagnózissal érkezett páciens biológiai mintája került feldolgozásra. Vizsgálatunkba azok a betegek kerültek bevonásra, akiknél egyértelműen azonosíthatók voltak az alábbi, a Movement Disorder Society (MDS) kritériumai alapján Parkinsonizmusra utaló tünetek, mint a bradykinesis együttes jelenléte vagy nyugalmi tremorral vagy merevséggel vagy mindkettővel [22]. Minden esetet neurológus szakorvos referált a genetikai vizsgálatra. A betegek csoportosítása során elkülönítettük a juvenilis (AOO <25), a korai (AOO 25-50 év) és a késői (AOO >50) kialakulású Parkinsonizmust. Ezen kívül a kohortunkban egy esetet familiáris jellegűnek jelöltünk, ha a felmenők között előfordult Parkinsonizmus vagy egyéb igazolható neurodegeneratív betegség. Minden beteg Magyarországon született és magyar felmenői voltak. A nem rokon egészséges alanyokat ($n = 55$, átlagos AOO = $59,7 \pm 17,80$) és a neurodegeneratív tünetek nélküli betegeket ($n = 82$, átlagos AOO = $45,1 \pm 15,47$), akik esetében teljes exom vagy teljes genom adatok álltak a rendelkezésünkre, kontrollként vizsgáltunk. Ezenkívül kizártuk a környezeti tényezők által okozott másodlagos Parkinsonizmust.

A doktori értekezés elkészítéséhez 152 korai kezdetű PD beteg került beválogatásra (AOO: $40,3 \pm 6,92$). Közülük 36 esetben volt pozitív a családi anamnézis (AOO: $37,8 \pm 7,76$) és 116 esetben sporadikus előfordulású volt a betegség (AOO: $41,1 \pm 7,55$). A nemek megoszlása a következőképpen alakult: 85 férfi és 67 női beteg volt a kohortban. A vizsgálatba bevont 30 késői indulású PD beteg közül minden esetben igazolható volt a családi halmozódás (AOO: $59,5 \pm 7,57$), közülük 14 férfi és 16 női beteg volt. A négy juvenilis indulású beteg közül egy esetben volt azonosítható a családi halmozódás.

A betegek és a kontrollok klinikai adatait és biológiai mintáit a Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetének biobankjából, a NEPSYBANK-ból gyűjtöttük [265]. A betegek és a kontroll személyek a Helsinkai nyilatkozattal összhangban beleegyező nyilatkozatot írtak alá a vérvétel és a molekuláris genetikai elemzés elvégzése előtt. A genetikai vizsgálatok elvégzését és az eredmények tudományos felhasználását a Magyar Tudományos és Kutatási Etikai Bizottság engedélyezte (37/2014 TUKEB).

3.2 DNS izolálása és tárolása

A genetikai vizsgálatokhoz a perifériás vért EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) csövekbe gyűjtöttük. Az izolálást Qiagen DNA Blood Mini kittel (Qiagen, Valencia, CA, USA) végeztük a gyártói protokoll szerint. Az izolálás során kinyert DNS mintákat -20°C -os fagyasztóban, hosszú távon -80°C -os ultramélyhűtőben kerültek tárolásra. A DNS minták a SE Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetében reverzibilisen, pszeudoanonimizált módon kerültek feldolgozásra. A vizsgált betegek, hozzátartozók és kontrollok biológiai mintáit és a kapcsolódó adatokat munkacsoportunk a NEPSYBANK-ban tárolja [265].

Az izolált DNS koncentrációját és tisztaságát Nanodrop 2000 spektrofotométerrel (Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific, MA, USA) ellenőriztük. A kapott DNS tisztasági értékét akkor fogadtuk el, ha a 260/280 abszorbancia hányadosnál 1,8-as érték fölötti értéket kaptunk.

3.3 Sanger szekvenálás

A PD-vel asszociált leggyakoribb gének vizsgálatát Sanger-féle bidirekcionális szekvenálással végeztük. A polimeráz láncreakció (PCR) során alkalmazott primerek (1. melléklet) specifikusak a teljes *PRKN* és *PINK1*, valamint a *LRRK2* gén 14 exonjára. Valamint indokolt esetben az *SNCA* és a *PARK7* gén teljes kódoló szakaszát is elemeztük. Minden PCR reakció során a reakcióelegy 7 μl steril, desztillált víz, 10 μl ImmoMix (Bioline, London, UK) – ez tartalmazza a reakcióhoz szükséges puffert, MgCl -ot, dNTP-t és a Taq polimerázt), 1 μl 10 μM forward primer (200 pM), 1 μl 10 μM reverz primer (200pM) és 1 μl DNS (20-30 ng) keveréke. Az amplifikációs PCR során 35 ciklussal dolgoztunk az alábbi beállításokkal: kezdeti hődenaturáció: 94°C 5 perc, denaturáció: 94°C 30 másodperc, anelláció: 60°C 30 másodperc, szintézis: 72°C 1 perc, végül 72°C 7 perc és 4°C végtelen. A PCR termék visszaellenőrzését 2%-os agaróz gélen végezzük (100 ml TAE puffer + 2 g agaróz). 5 μl PCR termékhez 1 μl brómfenolkéket tartalmazó loading puffert adunk, és ezt az elegyet visszük fel az agaróz géltre, majd 120V-on 30 percig futtatjuk. A PCR termék ellenőrzését követően megmaradt 15 μl PCR termékből a felesleges DNS-t és a primer dimereket SureClean PCR tisztító kittel (Bioline, London, UK) távolítjuk el a gyártó szerinti útmutatás szerint. A mintához az eredeti PCR termék térfogatával megegyező SureClean oldatot adunk (15 μl) és ehhez 1,5 μl koprecipitátor

festéket adunk, amely a DNS-t rózsaszínre festi. Alaposan vortexeljük az elegyet, majd 10 percet inkubáljuk szobahőmérsékleten, 10 percet centrifugáljuk 13200 rpm-en. A felülúszót leszívjuk, vigyázva, hogy a rózsaszínre színezett termék a csőben maradjon. A pellethez az eredeti térfogat kétszeresének megfelelő (30 µl) 70%-os alkoholt adunk hozzá. A mintákat 10 sec-ig vortexeljük, ismét 10 percig centrifugáljuk 13200 rpm-en. Az alkoholt leszívjuk és kiszárítjuk a rózsaszín precipitátumot. A szárítást követően a mintához 14 µl steril desztillált vizet adunk, majd ezt a további felhasználásig 4°C-on tároljuk. A megtisztított termék 4 µl-éhez 1 µl 3.1. Big Dye Terminator enzimet adunk (BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing RR-24, ThermoFisher Scientific, MA, USA), 2 µl BigDye puffert (ThermoFisher Scientific, MA, USA), amely tartalmazza a fluoreszcensen jelölt dideoxinukleotidokat, valamint 2 µl desztillált vizet adunk. A szekvenálendő szakaszra specifikus 1 µl 10 µM forward vagy reverz primer (100pM) teszi specifikussá a reakciót. A szekvenáló PCR során 25 ciklussal dolgoztunk a következő beállításokkal: kezdeti hődenaturáció: 95°C 2 perc, denaturáció: 95°C, anelláció: 51°C 15 másodperc, szintézis: 60°C 4 perc, majd 4°C végtelen. A keletkezett terméket további felhasználásig -20°C-on tároljuk. A szekvenáló PCR során feleslegesen maradt BigDye enzimet és primereket BigDye XTerminator® Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) segítségével távolítjuk el. Mintánként 10 µl tisztított PCR terméket mérünk egy 96 lyukú 200 µl-es platebe. Az X-terminátor elegyből 55 µl -t mérünk minden mintára (X terminátor elegy: 45 µl SAM solution és 10 µl XTerminator Solution). A platet 40 percig 1500 rpm-en rázatjuk, majd centrifugáljuk 2 percig, 1000 rcf-en. A plate fóliát septára cseréljük, majd a plate-t rögzítő keretbe helyezük, és lehetőség szerint azonnal visszük tovább. A kérdéses szakaszok szekvenálását 8 kapillárisos ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer szekvenátorral (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) végeztük. A futtatást a 3500 Data Collection Software nevű programmal végezzük. A kapilláris elektroforézis segítségével meghatározott szekvenciákat az NCBI – BLAST program segítségével a humán referencia genomhoz illesztjük (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>). Minden esetben az adott gén kódoló exonjait, illetve határoló régióit (*PRKN*, ENST00000366898.5, NM_004562; *PINK1*, ENST00000321556, NM_032409.2; *PARK7*, ENST00000338639.10, NM_007262.5; *LRRK2*, ENST00000298910.11, NM_198578.3; *SNCA*, ENST00000420646, NM_007308.2) elemeztük.

3.4 MLPA

Az MLPA módszerrel (Multiplex Ligáció-függő Próba Amplifikáció; MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) egyszerre vizsgálható több PD-asszociált gén exonjainak kópiaszám eltérése, valamint bizonyos pontmutációk jelenléte. A protokoll alapján az első nap a minták DNS koncentrációját NanoDrop készülékkel mérjük meg, és 100 ng-nak megfelelő mennyiséget PCR csövekben kiegészítjük TE pufferrel 5 µl-re. Ezután az első lépés a DNS denaturálása és hibridizálása a Salsa MLPA P051-Parkinson mix 1 D1-0115 próbamix (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands) segítségével. Ez a próbamix *SNCA*, *PRKN*, *PINK1*, *PARK7* és *ATP13A2* (exon2 és 9) génekre és két pontmutációra specifikus próbát is tartalmaz (A30P – *SNCA* génben és G2019S – *LRRK2* génben). A mintákat PCR készülékben 98°C-on 15 percig denaturáljuk, majd 25°C-on hozzáadjuk a 3 µl próbamixet (1,5 µl próbamix + 1.5 µl SALSA MLPA puffer). A hibridizáció 60°C-on 18 órán át tart. Második nap összemérjük a ligációs-mixet: 3 µl LigA, 3 µl LigB ligációs puffer, 1 µl Lig65 ligáz enzim és 25 µl molekuláris biológiai tisztaságú víz, majd 54°C-on hozzáadjuk a mintákhoz, a ligációs folyamat 15 percig zajlik. Végül a rendszert 98°C-ra melegítve a ligáz enzim inaktiválódik. Ezután összemérjük a PCR master mixet (0,5 µl SALSA polymerase + 2 µl SALSA PCR mix + 7,5 µl molekuláris biológiai tisztaságú víz), a mintákhoz adjuk 60°C-on és elindítjuk a PCR reakciót (60°C 2 perc, 95°C 15 másodperc, 36 x (95°C 30 másodperc + 60°C 30 másodperc + 72°C 1 perc), 72°C 20 perc, 4°C végtelen). Az így keletkező termékek mennyisége egyenesen arányos lesz a mintában lévő célszekvencia kópiaszámával. A beépülő primer pár egyik tagját fluoreszcens festékkel jelölték, így a keletkezett PCR termékek fluoreszcensen jelöltek és kapilláris elektroforézissel detektálhatók, valamint méret szerint szeparálhatók. A termékek 130-490 bp közötti mérettartományba esnek, az egyes exonok közötti különbség 8-10 bp. Az adatok kiértékelését az MRC-Holland által létrehozott Coffalyser.Net programmal végezzük (MRC-Holland, Amsterdam, Netherlands). Az egyes exonok azonosítása a méret marker alapján történik. Az eredményként kapott arány, az ún. dózis kvóciens (DQ) az adott minta relatív próba arányának és a kontroll minták átlagos relatív próba arányának a hányadosa. Minden próbára kiszámoljuk a DQ értéket, amely jelezheti a deléción vagy duplikáción meglétét az adott cél régióban.

3.5 *C9orf72* fragment analízis

A *C9orf72* GGGGCC hexanukleotid ismétlődés-szám meghatározása az ún. repeat-primed (rt) PCR reakcióval és az azt követő fragment analízissel történt. A rt-PCR során egy anchor és sense primerrel felsokszorozzuk az adott DNS szakaszt, valamint egy FAM-mal jelölt antisense primert is adunk az elegyhez, mely 4 db GGCCCC ismétlődést tartalmaz, így a sense és anchor primerrel ellentétben nem a hexanukleotid ismétlődő szakasz végéhez tud kötődni, hanem az ismétlődő szakaszhoz. A reakcióhoz használt primerek szekvenciáit a 2. melléklet tartalmazza.

A PCR reakcióhoz 0,4 µl-t adunk mindegyik primerből, valamint 10 µl MyTaq, 4 µl Betain és 1 µl DMSO reagenst használunk, melyek tartalmazzák a reakció lejátszódásához szükséges összes további komponenst. A 20 µl-es elegyet ezt követően Veriti thermocycler-ben (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) a 3. mellékletben leírt programon futtatjuk le.

A PCR reakciót követően a fragmentek hosszát kapilláris alapú gélelektroforézissel analizáljuk, melyek így 6 bázispár ismétlődéssel jellegzetes fűrészfog-mintázatot alkotnak. Ehhez a fragment mellett LIZ 600 és formamid reagensekre van szükség, a denaturálási kondíció pedig 95°C 3 percig, majd 4°C-on állhat a reakció, míg a vizsgálatot elvégezzük. Az ismétlődések számát számítógépen, a GeneMapper (Waltham, MA, USA) nevű szoftver segítségével tudjuk meghatározni.

3.6 Újgenerációs szekvenálás

Összesen 66 beteg és 137 kontroll személy esetében volt lehetőségünk újgenerációs szekvenálással elemezni a genetikai architektúrát. A betegcsoporton belül 50 esetben célzott génszekvenálást hajtottunk végre, ahol összesen 127 gént elemeztünk (4. melléklet). Minden általunk vizsgált gént korábban már összefüggésbe hozták a neurodegeneratív betegségek patomechanizmusával. A gének kiválasztása során olyan génekre fókuszáltunk elsősorban, amelyeket korábban nagy biztonsággal asszociálták a PD-vel vagy nagy eséllyel okozhat átfedő fenotípusú neurodegeneratív betegséget. Teljes exom szekvenálásra 16 beteg esetében volt lehetőségünk. A szekvenáláshoz a genomiális DNS könyvtárak esetén SureSelectQXT Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing és Agilent SureSelectQXT Human All Exon v5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) könyvtárkészítő reagenst használtuk a gyártói kézikönyv előírása

szerint, előbbit a célzott, utóbbit a teljes exom szekvenáláshoz. A minták DNS koncentrációját Qubit készülékkel mértük le a gyártói protokoll alapján és 25 ng/ μ l koncentrációjúra hígítottunk minden mintát. Első lépésben a genomiális DNS fragmentálása és adaptor-taggal történő ellátása zajlik. Ezután AMPure XP gyöngyök segítségével megtisztítottuk a mintákat, majd az adaptor-tagekkel ellátott mintákat felsokszoroztuk, és kijavítottuk az egyes amplikonok végeit is. Ezt követően ismét AMPure XP gyöngyök segítségével tisztítottuk meg. Ezután a DNS könyvtárak mennyiségét és minőségét Agilent 2100 Bioanalyzer and DNA 1000 Assay (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) felhasználásával becsültük meg. A genomiális DNS teljes amplifikálása után a cél régió kiválasztása speciális RNS próbák hibridizálásával és szelektív megkötésével történt. A meghatározott koncentrációjú DNS könyvtárakból azonos mennyiséget (kb. 750 ng) használtunk kiindulásnak. Ezután az ún. “csaliként” használt RNS molekulákkal, amelyek a cél régióra specifikusak, kihalásztuk azokat a DNS fragmenteket, melyekkel komplementer módon hibridizálódtak. Ezután streptavidines mágneses gyönggyel (Dynabeads MyOne Streptavidin T1 magnetic beads, ThermoFisher Scientific, MA, USA) elválasztottuk a biotinnal jelölt RNS-DNS hibrideket (a csali RNS biotinilált). A cél régióra specifikus amplikonokat index szekvenciával láttuk el, hogy lehetővé tegyük 46 minta egyidejű szekvenálását. Az utolsó AMPure XP gyöngyök segítségével történő tisztítás után Agilent 2100 Bioanalyzer and High Sensitivity DNA Assay (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével meghatároztuk a kész könyvtárak koncentrációját és átlagos amplikon hosszát. Ezután ekvimoláris mennyiségben összemértük az egyszerre szekvenálandó kész könyvtárakat. A szekvenálás MiSeq készüléken történt, duális indexelés mellett az amplikon mindkét végéről 150-150 bázispárt leolvastva MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles) reagenssel (Illumina, San Diego, CA, USA). A teljes exom szekvenálás hasonló paraméterekkel történt Illumina HiSeq 2500 készüléken HiSeq SBS Kit v4 reagens felhasználásával. A szekvenálást megelőző kluszter generálás HiSeq PE Cluster Kit v4 reagenssel történt cBot készüléken (Illumina, San Diego, CA, USA).

3.7 Bioinformatikai elemzés

Az NGS adatokból történő variáns hívás a GATK HaplotypeCaller (version 3.3-0) szoftver segítségével a GATK Best Practices Guidelines-t követve történik [266]. Az így

kapott VCF (Variant Call Format) fájlok annotálását az SnpEff szoftver [267] és a ClinVar adatbázis [268] felhasználásával végeztük el. A variánsok szűrése a szekvencia adatokból a VariantAnalyzer szoftver segítségével történik, melyet a Budapesti Műszaki Egyetem munkatársai fejlesztettek. Az újonnan leírásra került variánsok klasszifikálása az ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) által közzétett útmutató alapján történik [269, 270]. Az egyes variánsok minor allél frekvenciáját (MAF) is figyelembe vettük, különös tekintettel a ritka variánsokra, melyek esetében a MAF nem haladja meg az 1%-os előfordulási gyakoriságot. A MAF értékeket több adatbázis alapján becsüljük úgy, mint az 1000 Genomes Project (1KG), az Exome sequencing project (ESP), az Exome Aggregation Consortium Database and Genome Aggregation Database (gnomAD v2.1), valamint a „non-neuro” (non-Finnish) populációt felhasználva.

Az elemzés során a következő lépésben a betegségekkel asszociált ismert variánsokat szűrtük ki. Majd a funkcióvesztéses (nonszensz, stop vesztő/stop szerző, frameshift, kanonikus splice) variánsokat, és azokat a misszensz variánsokat, amelyeket több predikciós algoritmus alapján is potenciális káros hatással lehetnek a fehérje funkciójára, megtartottuk további elemzésre. Továbbá a nem-szinonim eltéréseket a dbNSFP adatbázis alapján is osztályoztuk [271].

Azok a variánsok, melyek a fent leírt kritériumoknak megfeleltek, és nem voltak jelen a kontroll csoportban sem, káros mutációként azonosítottuk, és Sanger szekvenálással validáltuk. Azokban az esetekben, ahol lehetőségünk volt ott a családtagoknál is megvizsgáltuk az adott variáns előfordulását, és szegregációját az adott fenotípussal.

3.8 Statisztikai elemzés

Az esélyhányadokat (odds ratio, OR) és a 95%-os konfidencia intervallumot (CI) a Medcalc szoftverrel számoltuk ki (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). A kvantitatív változók átlaga \pm standard eltérés (SD) felhasználásával kerültek leírásra.

Elemeztük a ritka variáns teher hatását a tünetek megjelenésének időpontjára. Nevezetesen, a nulla (87 beteg), az egy (46 beteg), a két (8 beteg) szűrt variánssal rendelkező korai indulású betegcsoportokba tartozó betegek AOO-jait ANOVA teszttel hasonlítottuk össze. Mivel három együttesen előforduló variánst csak egy betegnél azonosítottunk, ezt a beteget kizártuk a statisztikai elemzésből.

Az oligogénes hatás lehetőségének vizsgálatára az alábbi elemzést végeztük el. Kiszámítottuk a variáns terhelést azokban az egyénekből, akiknél NGS (akár célzott panelen szekvenálás, akár WES) analízist végeztünk. Mindkét esetben azonos génkészletet elemeztünk, amelyet magára a célzott szekvenálásra létrehozott PD-NGS panel is lefedett (1. és 2. táblázat).

Az analízishez a következő csoportokat hoztuk létre: 1.) Kontroll csoport (n=124): ez egészséges személyekből (n=21), nem neurológiai betegségben szenvedő betegekből (n=45) és mitochondriális rendellenességben szenvedő betegekből (n=58) áll. 2.) Nem-PD neurodegeneratív csoport (n=106). Ezeket a betegeket neurodegeneratív betegséggel diagnosztizálták, a PD típusos tünetei nélkül (mint például örökletes spasticus paraparesis - HSP, ataxia, amyotrophias lateralis sclerosis - ALS és demencia). 3.) PD-ben szenvedő betegek, akik NGS-tesztelésen estek át (n=54).

A variáns-terhet úgy definiáltuk, mint a szűrt variánsok teljes számát minden génben, amely az NGS célzott panel felhasználásával analízisre kerülhetett (összesen 127 gén). A heterozigóta variánsokat 1 találatnak, a homozigóta variánsokat 2 találatnak számoltuk. A 127 gén minden találatának összegzése eredményezte a végső variáns terhelést. Ezután elemeztük ugyanabból a mintából származó egyes variáns teher megoszlását a három csoportban (kontroll, PD, nem-PD neurodegeneratív) a Kruskal-Wallis teszttel. Az egyre szigorúbb szűrőkritériumok alkalmazásával kiszámítottuk a variáns terheket, és minden szinten teszteltük a statisztikai szignifikanciát a három fent definiált csoportban. A következő szűrési kritériumokat hoztuk létre: A) a maximális MAF bármely populációban <1%, ÉS a mutáció hatása vagy funkcióvesztés (stop szerző, stop vesztő, leolvasási keret eltolódás, kanonikus splice) vagy misszensz. B) Ugyanaz a szűrő, mint az A) esetében, de csak azokat a misszensz variánsokat vettük figyelembe, ahol több predikciós algoritmus valószínűsítette a káros hatást. C) Ugyanaz a szűrő, mint az A), de csak azokat a variánsokat tartottuk meg, amelyek az alapvető PD génlistához tartoznak. Ezek a gének az OMIM adatbázisban vagy a GeneReviews-ban felsorolt, a Parkinsonizmus mendeli-formáival asszociált gének uniója, nevezetesen: *GBA*, *LRRK2*, *PARK7*, *PINK1*, *PRKN*, *SNCA*, *VPS13C*, *VPS35*, *ATP13A2*, *DNAJC6*, *FBXO7*, *SLC6A3*, *SYNJ1*, *DNAJC13*, *CHCHD2*, *PLA2G6*, *EIF4G1*. D) Ugyanaz a szűrő, mint a C), de csak azokat a misszensz variánsokat vettük figyelembe, ahol több predikciós algoritmus valószínűsítette a káros hatást.

4 Eredmények

4.1 Szekvenálás és MLPA

A genetikai vizsgálat során 186 beteg esetében került sor a leggyakoribb PD-asszociált gének Sanger-típusú szekvenálására és MLPA elemzésére. Újgenerációs szekvenálást végeztünk 66 esetben, ahol az elsődleges genetikai elemzés nem volt teljesen egyértelmű vagy negatív lett, és valószínűsíthető volt a genetikai meghatározottság.

A genetikai elemzés során azonosított variánsokat négy csoportra osztottuk: (1) Ritka, károsító eltérések PD-asszociált génekben, amelyek potenciálisan összeegyeztethetők a monogén PD formával; (2) Korábban már PD-vel asszociált genetikai rizikó variánsok; (3) „Többszörös-találat” mechanizmus, amely befolyásolja a PD kockázatát; (4) Monoallélikus heterozigóta variáns az AR-PD-vel társított génben. Továbbá külön vizsgáltuk a *POLG* variánsainak előfordulási gyakoriságát a kohortban.

4.1.1 Ritka, károsító eltérések PD-asszociált génekben, amelyek potenciálisan összeegyeztethetők a monogén PD formával

A *PRKN* gén 7. exon duplikációját négy sporadikus esetben találtuk meg. Továbbá egy sporadikus esetben a teljes *SNCA* gén duplikációját igazoltuk. Az *LRRK2* génben egy korábban már leírt patogén eltérést, az L1795F aminosavcserét [272], detektáltunk két esetben, ahol a családi anamnézis is pozitív volt (P15 és P150). Valamint három új, valószínűleg káros variánst azonosítottunk. A P123 betegben az eddig még nem leírt Y1649S aminosavcserét okozó mutációt az *LRRK2* génben, a P2 betegben a M1357T eltérést az *EIF4G1* génben és a *VPS35* génben lévő K552I eltérést a P152 betegben. A L2170W mutációt a *DNAJC13* génben bizonytalan jelentőségű variánsként klasszifikáltuk, mivel egyes tanulmányok szerint ez a variáns csak, mint minor genetikai kockázati tényező játszik szerepet a PD kialakulásában [273].

A familiáris PD-ben szenvedő P153 beteg esetében a *VPS35* génben elsőként írtuk le a K552I aminosavcserével járó eltérést. Az eltérés, a predikciós pontszámok és a ritka előfordulás alapján, potenciálisan károsító mutációként jellemezhető. A beteg típusos motoros tünetei mellett, enyhe kognitív hanyatlás és vascularis encephalopathia volt látható. Az *LRRK2* génben a P123 familiáris EOPD betegnél (AOO: 34) az elsőként leírt *LRRK2* Y1649S variánst, predikciós pontszámai és az egyedi jelenléte alapján a kohortunkban valószínűleg patogén variánsként írtuk le. Ezt a feltételezést támasztja alá

az a tény is, hogy a variáns a COR doménben helyezkedik el, amely feltételezhetően kritikus az *LRRK2* dimerképződés szempontjából [274]. Ez következésképpen megváltoztathatja a kináz aktivitást [275, 276].

A 3. táblázatban bemutatott variánsok közül egyiket sem azonosítottuk a kontroll csoportban és a *LRRK2* Y1649S mutáció a gnomAD adatbázisban sem volt jelen. Mindegyik fent leírt variáns olyan betegekben került azonosításra, akik Parkinsonizmus szempontjából familiáris halmozódást mutattak. A betegek legfontosabb tüneteit a 3. táblázat tartalmazza. A CNV-vel rendelkező betegek nem mutatnak atípusos neurológiai tüneteket és egyértelműségi okokból nem tartalmazza őket a 3. táblázat. Közülük három beteg ekvivalens és két beteg akinetikus-rigid típusú PD-ben szenved. A tünetek megjelenésének átlagos időpontja $41,5 \pm 11,6$ év volt ebben a csoportban.

3. táblázat AD-PD génnel asszociált ritka szubsztitúcióval rendelkező betegek

Rövidítésjegyzék: F: familiáris, AOO: tünetek megjelenésének ideje, T: tremor, R: rigiditás, B: bradykinesis, PI: posturalis instabilitás, MCI: enyhe kognitív hanyatlás, LRRK2: leucin rich repeat kinase 2, DNAJC13: DNAJ subfamily C member 13, EIF4G1: eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1, VPS35: vacuolar protein sorting 35, het: heterozigóta, P: patogén, D: káros, RF: rizikó faktor, ACMG: American College of Medical Genetics, LP: valószínűleg patogén, MAF: minor allél frekvencia.

* Általunk elsőként leírt variáns.

Páciens	Típus	AOO	Nem	Tünetek	Gén	Variáns	Zigotitás	Klinikai jelentőség	ACMG klasszifikáció	MAF	Beteg	Kontroll	Referencia
P15	F	25	nő	T, megváltozott kézírás, depresszió, szorongás	LRRK2	L1795F/c.5385G>T rs111910483	het	P	LP	<0.01	1/186	0/137	[272]
P123	F	34	férfi	T, R, B, PI, hypomimia, lefagyás, depresszió	LRRK2	Y1649S/c.4946A>C -	het	D	LP	-	1/186	0/137	*
P46	F	30	férfi	T, R, B, csökkent synkinesis, depresszió	DNAJC13	L2170W/c.6509T>G rs140537885	het	D/RF	LP	<0.01	2/66	0/137	[273]
P2	F	33	nő	T, csökkent synkinesis	EIF4G1	M1356T/c.4067T>C rs144059151	het	D	LP	<0.01	1/66	0/137	*
P150	F	59	nő	R, B, járási zavar, hypomimia, dysphagia	LRRK2	L1795F/c.5385G>T rs111910483	het	P	LP	<0.01	1/186	0/137	[272]
P153	F	62	férfi	B, PI, hipertonia, MCI, dystonia, hypokinesis, dysarthria, vascularis encephalopathia	VPS35	K552I/c.1655A>T -	het	D	LP	<0.01	1/66	0/137	*

4.1.2 Korábban már PD-vel asszociált genetikai rizikó variánsok

Az általunk vizsgált kohortban 27 sporadikus esetben azonosítottunk olyan eltérést, amely a PD kialakulási kockázatát növelheti (ez a sporadikus esetek 22,7%-a) (4. táblázat). Ez az arány körülbelül másfélszer akkora a familiáris esetekben (35,8%), ahol 24 beteg hordozott kockázatonövelő variánst. A vizsgált csoportban több heterozigóta *GBA* mutációt azonosítottunk úgy, mint a H294Q, E365K, T408M, N409S és L483P variánsokat, 11 betegben (16,9%) és 4 kontrollban (3,4%). Az azonosított H294Q, L483P és N409S *GBA* variánsokat, mint kóroki variánsokat, korábban már közölték biallélikus formában, Gaucher-kórban (GD) szenvedő betegekben. A T408M variáns a ClinVar adatbázis alapján benignus eltérés, az E365K pedig bizonytalan jelentőségű variáns a GD szempontjából. Ezzel szemben korábbi tanulmányok szerint a felsorolt variánsok, mint genetikai rizikó tényezők hozzájárulnak a PD kialakulásához [277, 278]. Továbbá két beteg esetében, két korábban PD-vel asszociált genetikai rizikó faktor együttes jelenlétét is azonosítottuk a *GBA* génben, a P18 és a P154 beteg esetében. A *GBA* heterozigóta eltérést hordozó páciensek körében több megkülönböztető klinikai jellegzetességet azonosítottunk, mint például a supranuclearis tekintés bénulást (P25), a nemgyógyszerelés-asszociált hallucinációt (P19), a depressziót és a szorongást (P13, P18), és a korai kognitív hanyatlást (P13, P24).

A családtagok elemzését három esetben állt módunkban elvégezni. A P10 beteg esetében a talált L483P/c.1448T>C mutáció előfordulását vizsgáltuk az apa, apai nagymama és a nőtestvére esetében, akik ugyanazt a ritka eltérést hordozták a *GBA* génben. A vizsgált nőtestvérnek LOPD-je volt, súlyos kognitív hanyatlással. Más családtagoknak nem volt semmilyen PD-re utaló tünete. A P13 beteg a H294Q/c.882T>G eltérést hordozta. Az apai nagyapának és a nagyapa férfitestvéreinek LOPD-je volt. Nekünk az apát sikerült genetikailag elemeznünk, akinek nem volt PD tünete, de heterozigóta formában azonosítható volt a vizsgált mutáció. A P25 páciens a heterozigóta T408M/c.1223C>T eltérést hordozta. A férfitestvéreinek hasonló tünetei voltak és szintén hordozta az adott heterozigóta szubsztitúciót. Egészséges édesanyjukban nem azonosítottunk eltérést a *GBA* génben, édesapjuk pedig 41 éves korában elhunyt. Az apa testvére szintén PD-ben szenvedett, ezért feltételezzük, hogy a proband és testvére apai ágon örökölte a c.1223C>T szubsztitúciót.

Az *LRRK2* génben, a heterozigóta M1647T mutációt hat betegben azonosítottuk, míg a kontroll csoportban nem detektáltuk ezt az eltérést. További 27 beteg esetében (14,5%) a *LRRK2* S1647T eltérést detektáltuk homozigóta formában, melyet korábban mint lehetséges, de gyenge hatású PD genetikai kockázati tényezőt azonosítottak [231]. Ezen kívül 14 kontroll egyénben (10,2%) is megtaláltuk az S1647T homozigóta eltérést.

A *PINK1* A340T eltérést hét esetben írtuk le a betegek és 12 esetben a kontrollok között. Érdekességként a P177 tremor domináns, familiáris PD-ben szenvedő betegnél (AOO: 51 év) a *PINK1* A340T eltérés együttesen volt jelen a *LRRK2* S1647T homozigóta kockázati variánssal. A *PINK1* G411S szubsztitúciót két betegben és egy kontrollban azonosítottuk az általunk vizsgált csoportban.

Az összes detektált eltérés, amelyet korábban genetikai rizikó tényezőként közöltek, OR>1 értéket vett fel, kivétel a *PINK1* A340T variánst, amelynél az OR: 0,4. Mindamellet csak a *GBA* T408M variáns esetében tudtunk szignifikáns összefüggést ($p<0,05$) kimutatni.

4. táblázat Korábban leírt PD-vel összefüggő genetikai rizikó variánsok

Rövidítésjegyzék: *GBA*: glucocerebrosidase, *LRRK2*: leucin rich repeat kinase 2, *PINK1*: PTEN-induced kinase, *het*: heterozigóta, *hom*: homozigóta, *MAF*: minor allél frekvencia, *AOO*: tünetek megjelenésének ideje, *SD*: szórás, *OR*: esélyhányados, *p*: szignifikancia.

* Általunk elsőként leírt variáns.

Páciens	Gén	Variáns	RS azonosító	Zigotitás	MAF	Beteg	Kontroll	Sporadikus	Familiáris	AOO (átlag±SD)	OR	p	Referencia
P10	<i>GBA</i>	L483P c.1448T>C	rs421016	het	<0,01	1/66	0/137	-	1	27	6,3	0,26	[278]
P13	<i>GBA</i>	H294Q c.882T>G	rs367968666	het	<0,01	1/66	0/137	-	1	30	6,3	0,26	[278]
P16, P17, P154	<i>GBA</i>	E365K c.1093G>A	rs2230288	het	0,01	3/66	1/137	2	1	48,7±4,2	6,5	0,11	[277, 278]
P8, P18, P23, P24, P25, P154	<i>GBA</i>	T408M c.1223C>T	rs75548401	het	<0,01	6/66	2/137	3	3	36,7±8,4	6,8	0,02	[277, 278]
P18, P19	<i>GBA</i>	N409S c.1226A>G	rs76763715	het	<0,01	2/66	1/137	2	-	36±7,1	4,3	0,24	[277, 278]
P26, P31, P43, P104, P171, P175	<i>LRRK2</i>	M1646T c.4937T>C	rs35303786	het	0,02	6/186	0/137	2	4	47,2±6,82	9,9	0,12	[279]
P1, P6-P7, P14, P21-P22, P40-P41, P51, P57-P58, P61, P73-P76, P88, P110, P117, P121, P124, P151, P160, P164-P165, P170, P177	<i>LRRK2</i>	S1647T c.4939T>A	rs11564148	hom	0,31	27/186	14/137	14	13	44±11,3	1,5	0,25	[231]
P11, P56, P62, P93, P172, P177, P184	<i>PINK1</i>	A340T c.1018G>A	rs3738136	het	0,05	7/186	12/137	4	3	43,3±18,7	0,4	0,07	[280]
P1, P28	<i>PINK1</i>	G411S c.1231G>A	rs45478900	het	<0,01	2/186	1/137	1	1	36,5±2,12	1,5	0,75	[281]

4.1.3 „Többszörös-találat” mechanizmus, amely befolyásolja a PD kockázatát

Egyéni szinten nem könnyű értelmezni a „többszörös-találat” mechanizmust annak ellenére, hogy az adatok elemzése során 12 olyan esetet találtunk, ahol egy heterozigóta károsító mutáció egy AR-PD-asszociált génben együttesen fordul elő, vagy egy már korábban leírt kockázati tényezővel, vagy egy ritka variánssal valamelyik másik PD-asszociált génben (5. táblázat). Az oligogénes modell létezése felmerül azokban az esetekben, ahol együttesen fordul elő egy kockázati variáns a *LRRK2* génben és egy heterozigóta misszensz eltérés a *PRKN*, *PINK1* vagy *SYNJI* génekben. Három esetben a *LRRK2* S1647T homozigóta rizikó variáns egyszerre volt jelen a *PRKN* (C446S), a *PINK1* (R501Q) vagy a *SYNJI* (Q1163E) heterozigóta variánsokkal. A ritka *PINK1* R501Q variánst egyöntetűen károsnak írták le az in silico predikciós programok és a kontroll csoportban sem volt jelen. A ritka *SYNJI* Q1163E szubsztitúciót nekünk sikerült először azonosítani, és a predikciós elemzés alapján károsítja a kódolt fehérje működését. Két további esetben a *LRRK2* M1646T aminosavcserét írtuk le más heterozigóta eltérésekkel együtt úgy, mint a káros predikciós pontokkal jellemzett *PRKN* R234Q eltérést a P26 betegben, és az eddig még nem leírt *DNAJC13* D1301V káros szubsztitúciót a P43 betegben.

A P7 beteg, aki egy 49 éves férfi (AOO: 43 év), járási nehézséget, bradykinesist, enyhe kéztremort és rövid távú memóriaproblémákat mutatott. A genetikai elemzés a *PRKN* génben a C446S heterozigóta, valószínűleg patogén mutációt azonosította, amelyet korábban még nem közöltek. Ugyancsak kimutattuk a homozigóta S1647T módosító faktort az *LRRK2* génben [231]. A P7 beteg édesapja, aki késői kezdetű PD-ben szenved, heterozigóta formában hordozza a *PRKN* C446S és a *LRRK2* S1647T eltéréseket. A P7 beteg egészséges édesanyja a *LRRK2* S1647T heterozigóta eltérést hordozza. Feltételezzük, hogy a *PRKN* C446S mutáció valószínűleg patogén, az in silico predikciós pontok és a szegregációs elemzés alapján. Együttes jelenléte a homozigóta *LRRK2* S1647T kockázati tényezővel alátámaszthatja az oligogénes öröklődést.

A *GBA* gén heterozigóta mutációját négy esetben azonosítottuk feltételezett „többszörös-találat” háttérrel. Egy típusos PD tüneteket mutató férfi betegben (P19) heterozigóta *TMEM230* I104L elsőként közölt eltérést, valamint a *GBA* génben a N409S aminosavcserét igazoltuk (OR: 4,05) [277, 278]. A P18 és a P154 betegek esetében két, korábban PD-vel asszociált genetikai rizikó faktor együttes jelenlétét is azonosítottuk a

GBA génben [277, 278]. A P18 betegben a T408M és a N409S heterozigóta eltérések voltak együttesen jelen. Ebben az esetben a típusos motoros PD tünetek mellett a nem-motoros tünetek között jelentős volt a depresszió és a szorongás. A P154 betegben az E365K és a T408M *GBA* rizikó variánsok mellett, a *DNAJC13* génben a S790Y variánst is azonosítottuk heterozigóta formában. Ez utóbbi variáns az irodalomban eddig még nem került leírásra, valamint a predikciós szoftverek alapján a fehérje funkciójára káros hatással lehet. A familiáris halmozódású, akinek típusú PD-ben szenvedő nőbetegnél extra tünetként szédülés és GERD is jelentkezett.

A P8 betegben a *DNAJC6* gén M133L heterozigóta, valószínűleg patogén variáns a korábban említett, *DNAJC13* L2170W variánssal egyszerre van jelen. A L2170W mutációt a *DNAJC13* génben bizonytalan jelentőségű variánsként klasszifikáltuk, mivel a bioinformatikai predikciós pontszámok arra utalnak, hogy az L2170W variáns károsítja a fehérje működését. Egyes tanulmányok szerint ez a variáns csak mint minor genetikai kockázati tényező (OR: 2,68) játszik szerepet a Parkinsonizmus kialakulásában, habár fontos hangsúlyozni a csökkent penetrancia lehetőségét [273, 282]. A *DNAJC6* M133L aminosavcsereéről szintén azt feltételezzük, hogy patogén a predikciós pontszámok és az alacsony frekvencia miatt. Ezen kívül a betegben a *GBA* T408M variánst is azonosítottuk heterozigóta formában, amely a korábbi tanulmányok szerint mint genetikai rizikó tényező hozzájárul a PD kialakulásához [277, 278]. Egy női betegben (P4) két eddig nem közölt variánst igazoltunk: egy lehetséges patogén szubsztitúciót a *SYNJ1* génben (E67A) és egy nonszensz mutációt a *C19orf12* (Leu61*) génben.

A pozitív familiáris anamnézissel rendelkező nőbeteg (P164) akinek típusú LOPD-ben szenved. A P164 beteg esetében a *LRRK2* génben az I803T heterozigóta eltérést azonosítottuk, amelyet eddig még nem közöltek és a gnomAD adatbázisban sincs jelen. Továbbá a predikciós eredmények alapján valószínűsíthető, hogy károsítja a fehérje funkcióját. Ehhez társul a *LRRK2* S1647T homozigóta rizikó variáns. A beteg édesanyjának szintén típusos LOPD tünetei voltak, viszont a genetikai diagnózis felállításakor már nem tudtunk tőle mintát venni a szegregációs analízishez. A proband egészséges nővére és egészséges gyermekei nem hordozzák a *LRRK2* I803T potenciálisan patogén eltérést, a *LRRK2* S1647T variáns pedig heterozigóta formában igazolódott a családtagokban.

Egy pozitív családi anamnézissel rendelkező férfi betegnél (P20) két különböző heterozigóta mutációt azonosítottunk, amelyek felelősek lehetnek a kialakult tünetekért (*DNAJC13* - R2115Q és *PLA2G6* - V630G). A betegnél a típusos PD tünetek megjelenését kognitív hanyatlás követte. A R2115Q variánsról korábban nem számoltak be, de a 2115-ös arginin leucinra történő cseréjét már korábban leírták, mint fehérje károsító eltérés [283]. Mivel ebben a pozícióban a fehérje erősen konzervált és a mutáció ritka, véleményünk szerint a R2115Q eltérés is hozzájárulhat a PD kialakulásához. A *PLA2G6* génben elsőként azonosított V630G mutáció a fehérje erősen konzervált, katalitikus doménjét érinti [284, 285], ami szintén utal a lehetséges kóroki hatásra. Az eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy ha egy genetikai kockázati tényező együttesen van jelen egy ritka heterozigóta káros mutációval, az a tünetek korábbi megjelenését eredményezi, különösen azokkal az esetekkel összehasonlítva, ahol egyedül csak egy genetikai PD kockázati faktor van jelen.

5. táblázat A PD kockázatát befolyásoló „többszörös-találat” mechanizmusa

Rövidítésjegyzék: AOO: tünetek megjelenésének ideje (age of onset), T: tremor, B: bradykinesis, R: rigiditás, AF: amaurosis fugax, PSP: progresszív supranuclearis bénulás, PI: posturalis instabilitás, MCI: enyhe kognitív hanyatlás, OH: orthostaticus hypotensio, RBD: REM (rapid-eye movement) alvási zavar, GERD: gastroesophagealis reflux betegség, GBA: glucocerebrosidase, TMEM230: transmembrane protein 230, DNAJC13: DNAJ subfamily C member 13, LRRK2: leucin rich repeat kinase 2, C19orf12: chromosome 19 open reading frame 12, SYNJ1: synaptojanin-1, PRKN: parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, DNAJC6: DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6, PLA2G6: phospholipase A2 group 6, het: heterozigóta, hom: homozigóta, RF: rizikófaktor, D: károsító, P: patogén, ACMG klassz.: American College of Medical Genetics klasszifikáció, US: bizonytalan jelentőségű variáns, LP: valószínűleg patogén, MAF: minor allél frekvencia, Ref.: referencia.

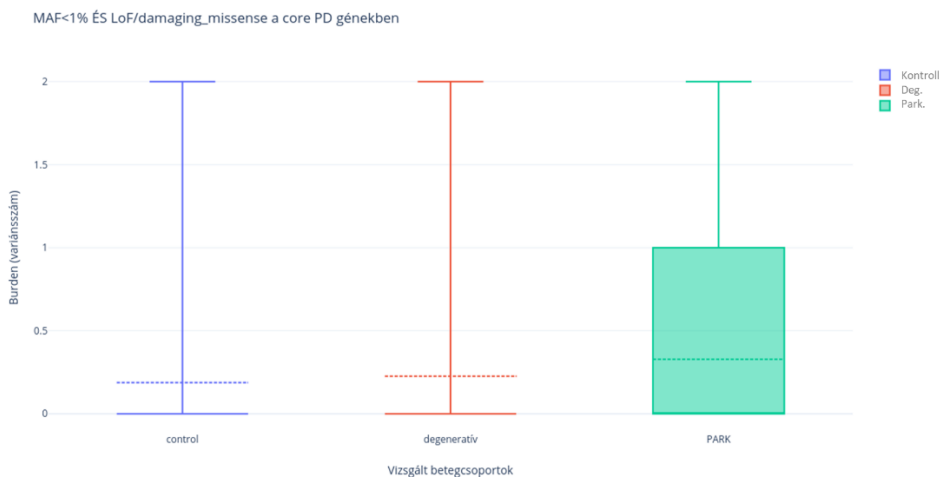
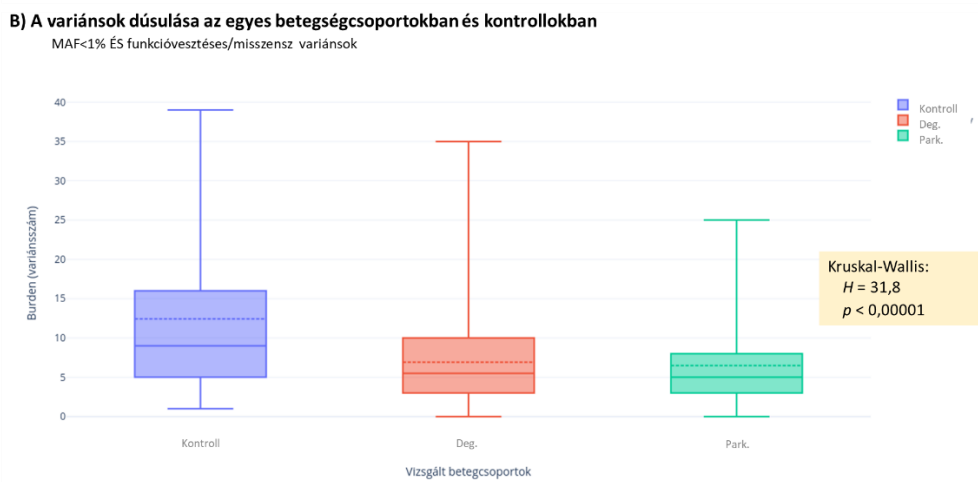
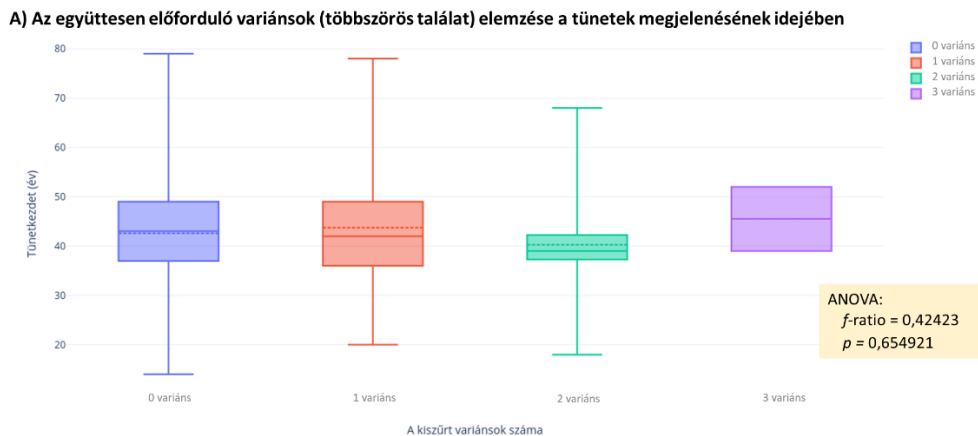
* Általunk elsőként leírt variáns. + Korábban leírt rizikó variáns.

Páciens	AOO	Nem	Tünetek	Gén	Variáns	RS szám	Zigotitás	Klinikai jelentőség	ACMG klasz.	MAF	Beteg	Kontroll	Referencia
Sporadikus esetek													
P18	31	férfi	T, B, R, gyakori lefagyás, depresszió, szorongás	GBA	T408M ⁺ /c.1223C>T	rs75548401	het	RF	-	<0,01	6/66	2/137	[277, 278]
				GBA	N409S ⁺ /c.1226A>G	rs76763715	het	RF	-	<0,01	2/66	1/137	[277, 278]
P19	41	férfi	T, dysarthria, AF, nystagmographia, PSP, perseveratio	TMEM230	I104L/c.310A>C	rs139824737	het	D	US	<0,01	1/66	0/137	*
				GBA	N409S ⁺ /c.1226A>G	rs76763715	het	RF	-	<0,01	2/66	1/137	[277, 278]
P43	38	nő	T, R, csökkent synkinesis	DNAJC13	D1301V/c.3902A>T	rs748182915	het	D/RF	LP	<0,01	1/66	0/137	*
				LRRK2	M1646T ⁺ /c.4937T>C	rs35303786	het	RF	-	0,02	6/186	0/137	[279]

Páciens	AOO	Nem	Tünetek	Gén	Variáns	RS szám	Zigozitás	Klinikai jelentőség	ACMG klasz.	MAF	Beteg	Kontroll	Ref.
Familiáris esetek													
P4	39	nő	T, B, R, PI, MCI, dysarthria, OH, alacsony vas-szint,	<i>C19orf12</i>	L61*/c.182T>G	-	het	P	P	-	1/66	0/137	*
				<i>SYNJ1</i>	E67A/c.200A>C	rs199750187	het	D	US	<0,01	1/66	0/137	*
P7	43	férfi	T, B, PI, dysarthria, dysdiadochokinesis hyposmia, MCI	<i>PRKN</i>	C446S/c.1336T>A	-	het	D	P	-	1/186	0/137	*
				<i>LRRK2</i>	S1647T ⁺ /c.4939T>A	rs11564148	hom	RF	-	0,31	27/186	14/137	[231]
P8	39	férfi	T, B, dysdiadochokinesis, csökkent synkinesis	<i>DNAJC6</i>	M133L/c.397A>T	rs61757223	het	D	US	<0,01	1/66	0/137	*
				<i>DNAJC13</i>	L2170W/c.6509T>G	rs140537885	het	D/RF	US	0,01	2/66	0/137	[282, 286]
				<i>GBA</i>	T408M ⁺ /c.1223C>T	rs386626586	het	RF	-	<0,01	6/66	2/137	[277, 278]
P20	39	férfi	T, R, PI, szorongás, MCI	<i>PLA2G6</i>	V630G/c.1889T>G	-	het	D	P	-	1/66	0/137	*
				<i>DNAJC13</i>	R2115Q/c.6344G>A	rs770715465	het	D/RF	US	<0,01	1/66	0/137	[283]
P21	39	nő	R, B, PI	<i>PINK1</i>	R501Q/c.1502G>A	rs61744200	het	D	US	<0,01	1/186	0/137	[168]
				<i>LRRK2</i>	S1647T ⁺ /c.4939T>A	rs11564148	hom	RF	-	0,31	27/186	14/137	[231]
P22	37	férfi	T, B, dysarthria, hypophonia, RBD, gyógyszer-kapcsolt fluktuáció-OFF dystonia, MCI, pánik rohamok,	<i>SYNJ1</i>	Q1163E/c.3487C>G	rs768503724	het	D	US	<0,01	1/66	0/137	*
				<i>LRRK2</i>	S1647T ⁺ /c.4939T>A	rs11564148	hom	RF	-	0,31	27/186	14/137	[231]
P26	40	nő	T, PI, megromlott látás, MCI	<i>PRKN</i>	R234Q/c.701G>A	rs144032774	het	D	US	<0,01	2/186	0/137	*
				<i>LRRK2</i>	M1646T ⁺ /c.4937T>C	rs35303786	het	RF	-	0,02	6/186	0/137	[279]
P154	52	nő	B, R, csökkent synkinesis, GERD, lefagyás	<i>DNAJC13</i>	S790Y/c.2369C>A	rs149121829	het	D	US	<0,01	1/66	0/137	*
				<i>GBA</i>	E365K ⁺ /c.1093G>A	rs2230288	het	RF	-	0,01	3/66	1/137	[277, 278]
				<i>GBA</i>	T408M ⁺ /c.1223C>T	rs75548401	het	RF	-	<0,01	6/66	2/137	[277, 278]
P164	68	nő	B, R, MCI	<i>LRRK2</i>	I803T/c.2408T>C	-	het	D	LP	-	1/186	0/137	*
				<i>LRRK2</i>	S1647T ⁺ /c.4939T>A	rs11564148	hom	RF	-	0,31	27/186	14/137	[231]

A „többszörös-találat” mechanizmus hipotézisének tesztelésére két különböző elemzést végeztünk el. Elsőként ANOVA tesztet futtattunk, hogy megállapítsuk az egynél több genetikai variánssal rendelkező betegek (5. táblázat) a tünetek megjelenésének idejében mennyire különböznek el azoktól a betegektől, akik csak egy variánssal rendelkeznek (3., 4., 6. táblázat). Csak egy tendenciát figyelhettünk meg, miszerint mind az átlagéletkor, mind a medián alacsonyabb a tünetek megjelenésének idejét tekintve az együttesen előforduló variánsok számának növekedésével, ám ez az esetünkben statisztikailag nem volt szignifikáns (4/A ábra).

Másodikként Kruskal-Wallis statisztikai elemzéssel vizsgáltuk a hipotézisünket, vagyis azt a feltételezést, hogy a Parkinsonizmussal diagnosztizált betegek esetében a PD-asszociált génekben nagyobb a variánsok száma, mint a nem PD-vel diagnosztizált neurodegeneratív betegekben és a kontroll személyekben, ahogyan ezt a 3.8. Statisztikai elemzés részben is leírtuk. Meglepő módon a legmegengedőbb szűrési kritériumok esetében (MAF<1%, ÉS funkcióvesztő vagy misszensz variáns) a kontroll csoportban szignifikánsan több variánst figyeltünk meg (4/B ábra) összehasonlítva a PD betegségben szenvedő csoporttal. Habár, amikor a fent leírt analízist szigorúbb kritériumokkal végeztük el (MAF<1% ÉS funkcióvesztő vagy káros misszensz variáns a fő PD génekben) azt figyeltük meg, hogy a különbség eltűnt, sőt úgy látszott, hogy az irány meg is fordult. Bár ez sem volt statisztikailag szignifikáns.



4. ábra A „többszörös-találat” mechanizmus elemzésének eredménye

Az A) panel az együttesen előforduló variánsok („többszörös-találat”) elemzésének eredményét mutatja a tünetek megjelenésének idejében. A dobozdiagram a tünetek megjelenési idejének megoszlását mutatja, ha 0, 1, 2, vagy 3 variáns van jelen egyidejűleg. A tömör vonalak a mediánt, a szaggatott vonalak az átlagot mutatják. Az

egy csoportok közötti különbség egyik esetben sem volt szignifikáns. A B) panel a variánsok dúsulását mutatja a 3.8 Statisztikai elemzés részben definiált csoportokban. Deg=neurodegeneratív betegségben szenvedő páciensek a Parkinsonizmus tüneteivel nélkül. Park=Parkinsonizmus tüneteivel rendelkező betegek. A legenyhébb és a legszigorúbb szűrőfeltételekkel kapott eredményeket szemléltetjük az ábrarészben. A felső részben a legenyhébb szűrőfeltételekkel láthatjuk, hogy a kontroll csoportban több variáns fordul elő, amely statisztikailag szignifikáns különbség. Az ábrarész alsó részén a legszigorúbb feltételekkel a különbség eltűnését figyelhetjük meg, valamint a tendencia feltételezhető átfordulását, habár ez statisztikailag nem szignifikáns.

4.1.4 Monoallélikus heterozigóta variáns AR-PD-vel társított génekben

A vizsgálat során négy AR-PD-vel asszociáló génben és egy feltehetően PD-vel asszociáló AR-NBIA-t okozó génben azonosítottunk potenciálisan károsító, monoallélikus, heterozigóta mutációt (6. táblázat). Mivel a *CP* fontos szerepet játszik az agyi vas anyagcserében, amely nagymértékben társul a PD-hez [287], a *CP* génben leírt károsító mutáció esetében azt feltételezzük, hogy fokozhatja a PD kialakulásának kockázatát. A *PRKN* génben három különböző eltérést azonosítottunk: két esetben familiáris, egy esetben pedig sporadikus háttérű betegekben.

A P147 betegben (AOO: 54) azonosított *PRKN* R234Q eltérést egy másik betegben (P26, 5. táblázat) is azonosítottuk egy *LRRK2* rizikó faktorral együtt, amely magyarázhatja a tünetek korábbi megjelenését (AOO: 40) a familiáris betegnél. A P162 férfi betegben a *PRKN* D243N eltérést azonosítottuk. Ez az eltérés a P162 beteg férfitestvérében is jelen volt, aki szintén késői indulású PD-ben szenved. A korábban patogénként leírt *PRKN* R275W eltérést [288] a P99 betegben írtuk le.

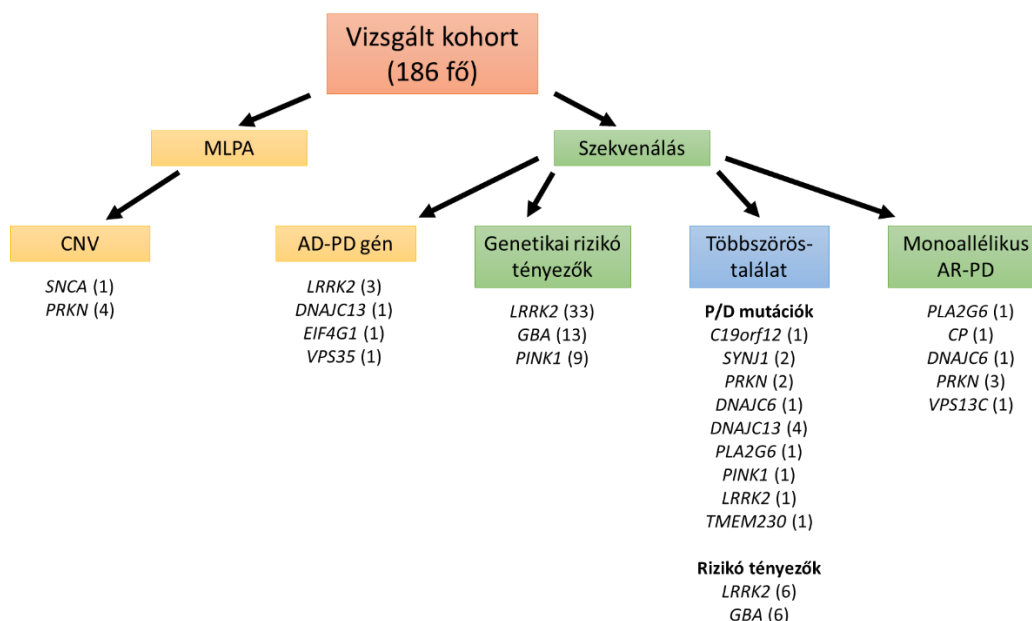
Egy familiáris esetben (P146) a S2904L heterozigóta variánst azonosítottuk a *VPS13C* génben. További három sporadikus esetben (P9, P27 és P36) feltételezhetően káros szubsztitúciót találtunk a *DNAJC6* (F414Y), a *CP* (I898M) és a *PLA2G6* (R396W) génekben. Érdekes, hogy a tünetek megjelenésének ideje inkább azokhoz az esetekhez hasonlít, ahol korábban leírt rizikó faktort azonosítottunk (3. táblázat), mint az AD-PD génben talált eltérések esetében, amelyeknél a tünetek átlagosan korábban indultak (2. táblázat).

6. táblázat Feltételezhetően releváns, ritka, monoallélikus, heterozigóta variánsok AR öröklésmentet mutató génekben

Rövidítésjegyzék: *F: familiáris, S: sporadikus, AOO: tünetek megjelenésének ideje, I: incontinentia, MRI: mágneses rezonancia képalkotás, R: rigiditás, T: tremor, B: bradykinesis, PI: posturalis instabilitás, MCI: enyhe kognitív hanyatlás, O: obstipatio, OH: orthostaticus hypotensio, VGP: vertikális tekintés bénulás, PLA2G6: phospholipase A2 group 6, CP: ceruloplasmin, DNAJC6: DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6, PRKN: parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, VPS13C: vacuolar protein sorting 13 homolog C, het: heterozigóta, D: károsító, RF: rizikó faktor, P: patogén, ACMG: American College of Medical Genetics, LP: valószínűleg patogén, US: bizonytalan jelentőségű variáns, MAF: minor allél frekvencia, OR: esélyhányados, p: szignifikancia. * Általunk elsőként leírt variáns.*

Páciens	Típus	AOO	Nem	Tünetek	Gén	Variáns	Zigotizás	Klinikai jelentőség	ACMG klasszifikáció	MAF	Beteg	Kontroll	OR	P	Referencia
P9	S	49	férfi	proximalis végtag gyengeség, spasticitás, I, hallucináció, MRI: súlyos fehérállomány laesio	<i>PLA2G6</i>	R39W/c.115C>T rs763352728	het	D/RF	LP	<0,01	1/66	0/137	7,7	0,21	*
P27	S	35	nő	R, T, I, hyposmia, hypokinesis, dysphagia, alacsony szérum CP szint	<i>CP</i>	I898M/c.2694T>G -	het	D/RF	LP	-	1/66	0/137	7,7	0,21	*
P36	S	42	nő	B, PI, dysarthria, hyposmia, MCI	<i>DNAJC6</i>	F414Y/c.1241T>A -	het	D/RF	LP	-	1/66	0/137	7,7	0,21	*
P99	S	42	férfi	T, R, B, PI	<i>PRKN</i>	R275W/c823C>T rs34424986	het	P/RF	LP	<0,01	1/186	0/137	2,4	0,54	[288]
P146	F	52	nő	T, R, micrographia, nehézkes mozgás koordináció, demencia, depresszió	<i>VPS13C</i>	S2904L/c.8711C>T rs115869241	het	D/RF	US	<0,01	1/66	1/137	2,6	0,66	*
P147	F	54	nő	T, R, csökkent synkinesis, micrographia, dysarthria, hypomimia, O	<i>PRKN</i>	R234Q/c.701G>A rs144032774	het	D/RF	US	<0,01	2/186	0/137	4,1	0,37	*
P162	F	62	férfi	T, B, R, OH, VGP, hypomimia, dysarthria, dysphonia, hyposmia, hypokinesis, O, I, szorongás, MCI	<i>PRKN</i>	D243N/c.727G>A rs146173584	het	D/RF	LP	<0,01	1/186	0/137	2,4	0,54	[289]

Összességében 6 esetben azonosítottunk valószínűleg káros eltérést AD-PD génben, míg 43 esetben találtunk csak egy rizikó faktort, mely növelheti a PD kialakulási kockázatát. A „többszörös-találat” mechanizmus jelenlétét feltételeztük 12 betegben, valamint további hét betegben találtunk monoallélikus, heterozigóta eltérést AR-PD génben, ami valószínűleg potenciális rizikófaktorként növelheti a PD kialakulásának esélyét. A kópiaszám elemzés során 5 esetben igazoltunk deléció vagy duplikáció MLPA metodikával. Az eredményeink összefoglalását az 5. ábra tartalmazza.



5. ábra A vizsgált kohortban azonosított eltérések megoszlása

A gének mögötti zárójeles szám: hány betegben találtunk az adott génben eltérést.

Rövidítésjegyzék: MLPA: multiplex ligáció-függő próba amplifikáció, CNV: kópiaszám variáns, AD-PD: autoszomális dominánsan öröklődő Parkinson-kórral asszociált gének, AR-PD: autoszomális recesszíven öröklődő Parkinson-kórral asszociált gének, SNCA: alpha-synuclein, PRKN: parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, LRRK2: leucin rich repeat kinase 2, DNAJC13: DNAJ subfamily C member 13, EIF4G1: eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1, VPS35: vacuolar protein sorting 35, GBA: glucocerebrosidase, PINK1: PTEN-induced kinase, P: patogén, D: káros, C19orf12: chromosome 19 open reading frame 12, SYNJ1: synaptojanin-1, DNAJC6: DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6, PLA2G6: phospholipase A2 group 6, TMEM230: transmembrane protein 230, CP: ceruloplasmin, VPS13C: vacuolar protein sorting 13 homolog C.

4.1.5 A *POLG* gén ritka variánsainak előfordulási gyakorisága a magyar PD kohortban

A *POLG* gén teljes kódoló régióját 66 Parkinsonizmus tüneteivel kezelt beteg esetében elemeztük. Az analízis során hat aminosavcserével járó eltérést azonosítottunk. A hat eltérés közül kettőt korábban polimorfizmusként írtak le (E1143G és Q1236H) [289, 290]. További három variánst azonosítottunk két betegben (T251I/P587L és G737R), melyek a korábbi irodalmi adatok alapján potenciális kóroki eltérések lehetnek. Valamint egy eddig még nem leírt eltérést (H613D) azonosítottunk a 2. esetben. A valószínűleg patogén eltéréseket a 7. táblázatban foglaltuk össze.

7. táblázat A *POLG* génben azonosított valószínűleg patogén jelentőségű misszensz variánsok

Rövidítésjegyzék: *P*: patogén, *US*: bizonytalan jelentőségű variáns, *ACMG* klassz.: American College of Medical Genetics klasszifikáció, *LP*: valószínűleg patogén, *MAF*: minor allél frekvencia.

* Általunk elsőként leírt variáns.

Variáns	Rs azonosító	Zigotitás	Klinikai jelentőség	ACMG klasszifikáció	MAF	Betegek	Kontrollok	Ref.
T251I c.752C>T	rs113994094	összetett het	P	LP	<0.01	1. eset	0/55	[223, 291]
P587L c.1760C>T	rs113994096		P	LP	<0.01	1. eset	0/55	
H613D c.1837C>G	-	het	US	LP	<0.01	2. eset	0/55	*
G737R c.2209G>C	rs121918054	het	P	LP	<0.01	3. eset	0/55	[292, 293]

1. eset

Az 57 éves, férfi beteg tünete 41 éves kora körül a bal kéz rigiditásával, ügyetlenségével kezdődtek, később a bal lábát is nehezebben mozgatta. Vizsgálatakor aszimmetrikus kevert tónuszavar (rigiditás és spasticitás) és dysdiadochokinesis jelenlétét és tremor hiányát azonosítottuk. A koponya MRI-n eltérést nem tudtunk igazolni. A DaTscan vizsgálat csökkent DAT szintet mutatott mindkét oldalon, a putamenben és a nucleus

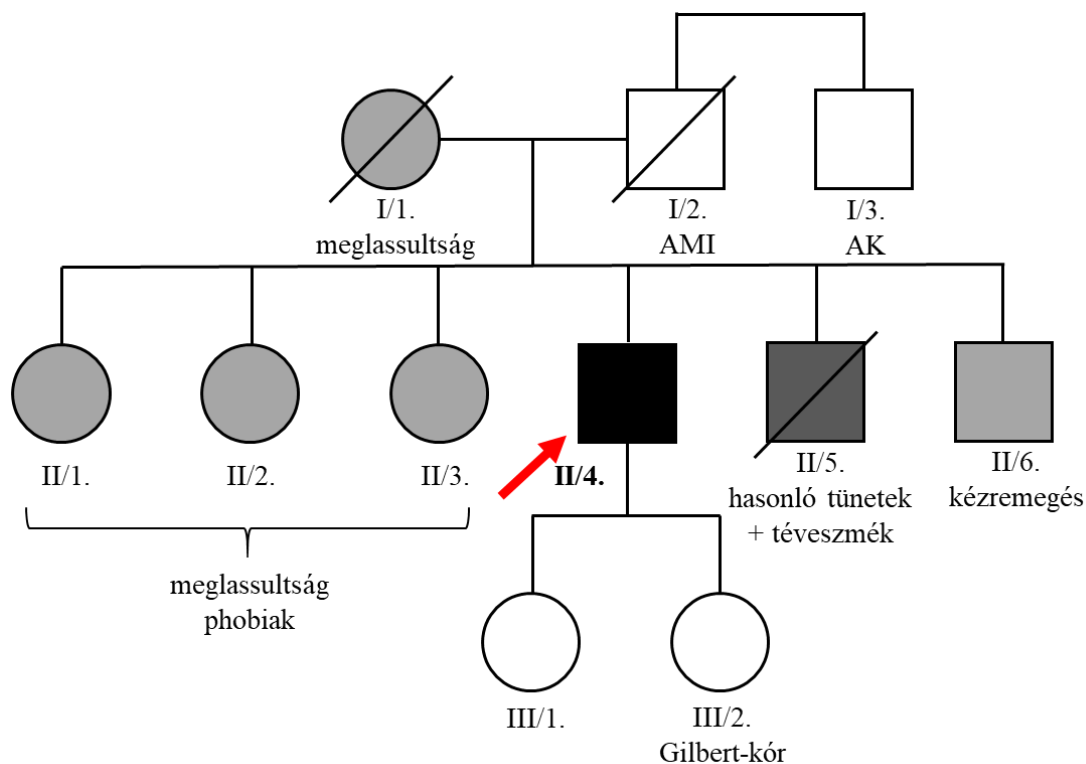
caudatusban, jobb oldali túlsúllyal. A betegség progressziója során motoros és nem-motoros fluktuáció jelentkezett, az OFF fázisokban a törzs izmaiban és a végtagokban fájdalmas dystoniával. Emellett pszichés tünetek is kialakultak. A nem-motoros tünetek közül obstipatio, alvászavar és krónikus fájdalom szindróma volt észlelhető. Szemmozgászavart nem észleltünk, de időszakosan diplopiáról számolt be a beteg. A későbbiekben súlyosbodó dysarthria, vegetatív zavarok és dopamin diszregulációs szindróma is jelentkezett. DBS (mélyagyi stimuláció) beültetésre került sor az egyre súlyosbodó motoros fluktuáció miatt. Kognitív hanyatlás nem igazolódott, a beteg dysthimiás. A családi anamnézisben apai ágon depresszió és suicidum fordul elő. A genetikai analízis során a *POLG* génben a T251I és a P287L variánsokat írtuk le összetett heterozigóta formában. A szegregációs vizsgálat elvégzésére nem volt lehetőségünk, de az irodalmi adatok alapján a két eltérés valószínűleg egy allélon helyezkedik el, ugyanis Aitken és mtsai. egy 58 éves női betegről számolt be, aki azonos mutációkkal rendelkezett és klinikailag homályos látás, kétoldali ptosis, diplopia, nyugtalan-láb szindróma és végtag gyengeség jellemezte [294].

2. eset

A 72 éves férfi tünetei 59 évesen akinetikus-rigid tünetekkel, elsősorban járászavarral kezdődött. A betegség lassan rosszabbodott. Már a tünetek első megjelenésekor orthostaticus hypotensio volt jelen. A koponya MRI nem vascularis típusú fehérállományi jelzavart azonosított. A Parkinsonizmus tüneteivel együtt balra tekintéskor enyhe tekintésirányú nystagmust, valamint enyhe cervicalis dystoniát azonosítottunk.

A beteg családfáját a 6. ábra szemlélteti. Fontos kiemelni, hogy a II/5 bátyjának hasonló tünetei voltak, továbbá súlyos téveszmékkel is küzdött (70 évesen exitált). A probandnál 10 évvel idősebb, II/6 bátyját kéztremor miatt kezelték. Lánytestvéreinél (II/1., 2., 3.) meglassultság és phobiás tünetek voltak jelen. A proband I/2. édesapja 63 éves korában, AMI (akut myocardialis infarctus) következtében exitált, nagybátyja (I/3.) Alzheimer-kórban szenvedett. A proband édesanyja (I/1.) esetében meglassultságról számoltak be, de ezen túl nagyobb betegsége nem ismert, 93 éves korában exitált. A probandnak két lánya van, a III/2. esetén Gilbert-kórt diagnosztizáltak. A genetikai elemzés során a H613D aminosavcserét elsőként írtuk le és a gnomAD adatbázisban sincs jelen, a

predikációs algoritmusok és az ACMG besorolás alapján ez az eltérés valószínűleg patogén.



6. ábra 2. esetet bemutató családfa

A H613D aminosavcserét a nyíllal kiemelt II/4. betegben azonosítottuk. A II/5. testvérnek hasonló tünetei és súlyos téveszméi voltak. A II/6. testvérnél kézremegés azonosítható. A II/1., 2. és 3. lánytestvéreknél meglassultság és phobiás mechanizmusok igazolhatók. Az I/2. édesapa AMI következtében exitált, az I/3. apai nagybáty Alzheimer-kóros. Az I/1. édesanya meglassult volt. A proband III/2. lánygyermeké Gilbert-kórban szenved. Rövidítésjegyzék: AMI: akut myocardialis infarctus, AK: Alzheimer-kór.

3. eset

A 69 éves férfi betegnek 58 éves korában akinetikus-rigid tünetekkel indult betegsége. A beteget depresszióval kezelik 54 éves kora óta, majd paranoiditás, élénk álmok és pánikrohamok jelentkeztek 64 éves korában. A későbbiekben kognitív hanyatlás kezdődött. Súlyos szubjektív panaszokat okozó szenoros neuropathia indult 60 éves kor körül. A beteg 62 éves korában elektrofiziológiai vizsgálatot végeztek a proximalis izmok gyengesége miatt, amely a neuromuscularis junctio jelátviteli zavarát vetette fel, és

tüneteinek kezelésére pyridostigmin használatát javasolták. A koponya MRI-n mérsékelt cerebrális és cerebellaris atrophia és bizonytalan jelentőségű fehérállományi laesiok is ábrázolódtak. A DaTscan vizsgálat dopaminerg károsodást jelzett. A beállított levodopa kezelésre kezdetben jól válaszolt, de pár év elteltével motoros fluktuáció jelentkezett és a levodopa igény is jelentősen megnőtt. A későbbiekben a súlyos motoros fluktuáció, az OFF fázisban jelentkező dystonia és a neuropathias fájdalom következtében LCIG kezelést indítottak el. Jelenleg a betegség előrehaladott stádiumban van, gyakori a lefagyás, a tartási instabilitás és a súlyos dysarthria.

Érdekes módon a családi anamnézisben az anyai és az apai oldalon is hasonló tünetekről számoltak be (édesanyjánál, anyai nagyanyjánál és édesapjánál is hasonló tünetek, többek között kéztremor volt jelen). A genetikai vizsgálat során leírt G737R eltérést eddig egy, korai-kezdetű Parkinsonizmus tüneteit mutató betegben írták le, összetett heterozigóta formában [292].

4.2 A *C9orf72* előfordulási gyakorisága a magyar PD kohortban

A kutatásunk során 147, magyar, nem-rokon Parkinsonizmus tüneteivel rendelkező beteg esetében vizsgáltuk a *C9orf72* hexanukleotid ismétlődés méretét repeat-primed PCR reakcióval. A vizsgált betegek megoszlását a kohorton belül a 8. táblázat szemlélteti.

8. táblázat A *C9orf72* hexanukleotid ismétlődés vizsgálatában résztvevő csoport

Rövidítésjegyzék: AOO: tünetek megjelenésének ideje, SD: szórás.

	Juvenilis		Korai		Késői	
	Nő	Férfi	Nő	Férfi	Nő	Férfi
Sporadikus eset	1	-	31	40	10	16
(átlag AOO±SD)	(18)	-	(39,8±7,13)	(40,1±7,35)	(59,8±7,39)	(60,6±7,93)
Familiáris eset	-	1	12	14	10	12
(átlag AOO±SD)	-	(14)	(37,4±9,07)	(38,6±7,14)	(58,9±8,3)	(56,6±4,25)

A vizsgált 147 beteg közül, 2 esetben azonosítottunk 30 fölötti ismétlődés-számot (egy esetben 31 és 32 ismétlődés-szám), amely az esetek 1,4%-a. Az esetek 8,8%-a (13 db) 23 és 30 ismétlődés közötti intermedier mutáció (9. táblázat). A kóros ismétlődés-számot mutató páciensek átlagos életkora a tüneteik megjelenésekor $55,67 \pm 12,68$ év volt. Az intermedier esetekben a tünetek megjelenésének átlagéletkora $37,86 \pm 10,67$ év volt. A pozitív esetek közül egy esetben volt pozitív a familiáris anamnézis. A férfi beteg

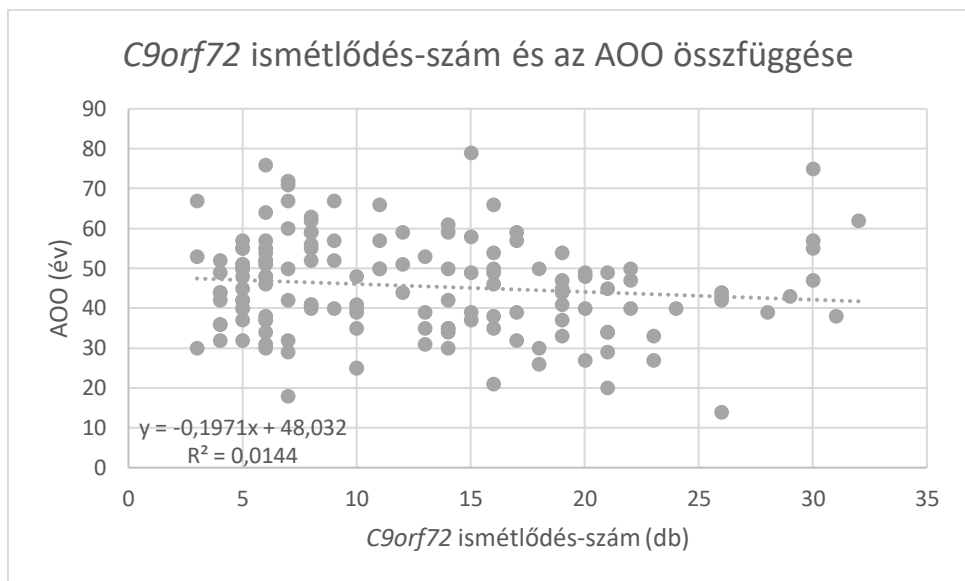
öt évvel idősebb bátyja is érintett, akinél a *C9orf72* repeat expanzió meghatározása során 29 volt a hexanukleotid ismétlődés-szám, amely még intermedier típusnak adódik. Tüneteinek kezdete 8 évvel későbbre, 70 éves korára tehető. Az egyik pozitív esetben igazoltunk csak kognitív hanyatlást, illetve két további intermedier esetben. A levodopa kezelés 10 esetben (egy pozitív, kilenc intermedier) a tünetek javulását eredményezte, egy intermedier esetben (juvenilis férfi beteg) pedig nem volt tapasztalható válasz.

9. táblázat A pozitív és intermedier esetek

Rövidítésjegyzék: S: sporadikus forma, F: familiáris forma, AOO: tünetek megjelenésének ideje, ak-rig: akinetikus-rigid domináns forma, ekv: ekvivalens forma, tremor: tremor domináns forma, CI: kognitív hanyatlás, +: jelen van, -: nincs jelen.

	Ismétlődés-szám	Nem	Típus	AAO	Első tünet	CI
Pozitív esetek	32	férfi	F	62	tremor	-
	31	nő	S	38		+
Intermedier esetek	30	férfi	F	47	ekv	-
	30	férfi	S	55	ak-rig	-
	30	nő	S	75	ekv	-
	30	nő	S	57	ak-rig	-
	29	férfi	S	43	tremor	-
	28	férfi	F	39	ak-rig	-
	26	férfi	F	14	tremor	+
	26	nő	S	44	ak-rig	+
	26	nő	S	42	tremor	-
	26	nő	S	43	tremor	-
	24	férfi	F	40	tremor	-

A *C9orf72* hexanukleotid repeat expanzió és a tünetek megjelenésének időpontja között nem mutattunk ki lényeges összefüggést (7. ábra).



7. ábra A tünetek megjelenése és az ismétlődés-szám közötti összefüggés

Az y tengelyen a vizsgálatban résztvevő páciensek életkora az első tünetek megjelenésekor (AOO); a x tengelyen pedig a GGGGCC hexanukleotid ismétlődés-szám szerepel.

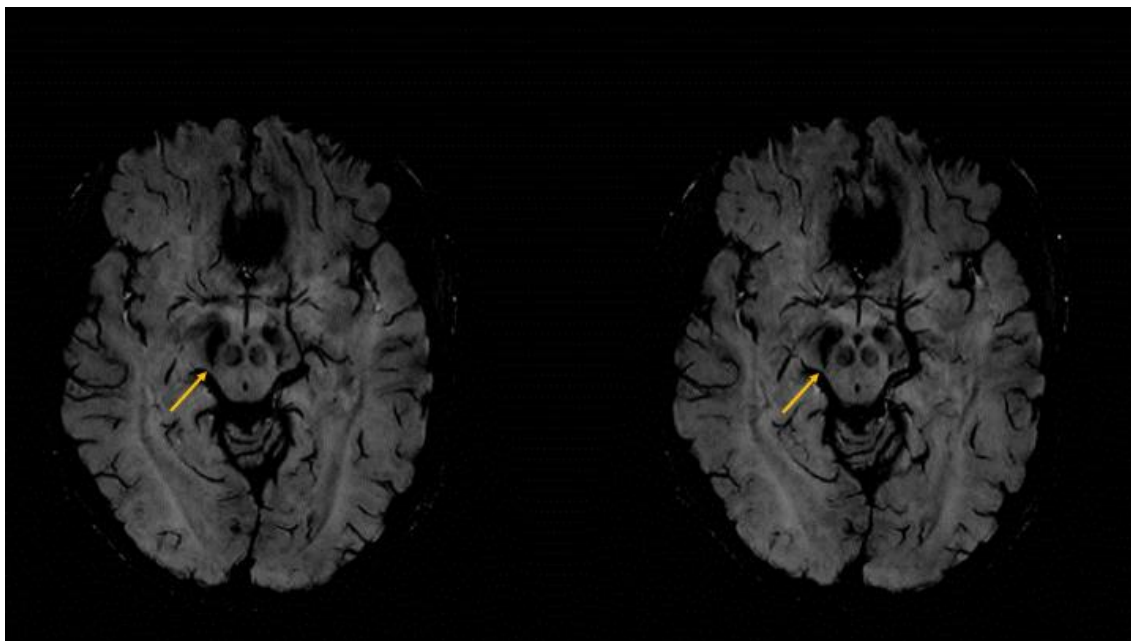
A kohortbeli ismétlődés-számok gyakoriságának eloszlásáról készített ábrán jól látható, hogy 3-as és 32-es ismétlődés-szám közötti értékeket kaptuk a vizsgálataink során (7. ábra). A legnagyobb talált ismétlődés-szám a 32 volt, melyet egy familiáris LOPD férfi páciensben azonosítottunk.

4.3 A környezeti és a genetikai rizikó tényezők kölcsönhatásának elemzése egy eset bemutatásán keresztül

Egy 44 éves, kézremegés tünetével érkező férfi beteget vizsgáltunk a neurogenetikai szakrendelésen. A kórtörténetben gastro-oesophagealis reflux betegség (Los Angeles A fokozat), LIV-V discus herniáció és I. típusú (Wenckebach) második fokú atrioventrikularis blokk volt jelen. Ez utóbbi nem okozott tüneteket, és orvosi beavatkozásra nem volt szükség. A beteg pantoprazolt szedett rendszeresen. A kézremegés megjelenése előtt, a beteg 18 hónapon át rendszeresen használt kokaint nazálisan (napi ~1 g-ot – 15 mg/kg). A kokain használata során ingerlékenység és álmatlanság, valamint disszociatív tünetek, mint például a deperszonalizáció és a derealizáció jelentkeztek a páciensnél. Ez utóbbi miatt 10 hónappal a vizsgálat előtt már

abbahagyta a kokain használatát. Körülbelül 3-4 hónappal a drog-használat befejezése után észlelte a kéztremort.

A neurológiai vizsgálat során a kéztremor aszimmetrikusan jelentkezett jobb oldali túlsúllyal, és elsősorban posturalisan volt növelhető kis súlyok tartásával. Ezen kívül enyhe Parkinsonizmus jelei (enyhe bradykinesis és rigor a jobb kézben) is kimutathatók voltak. Összességében a neurológiai vizsgálat kezdeti Parkinsonizmust valószínűsített, de a remegés atípusos volt (nem nyugalmi-típusú). A tremorok MDS besorolása szerint [295] izometrikus tremor szindrómaként osztályoztuk. A családi kórtörténetből kiemelendő, hogy a beteg apja idősebb korban posturalis kéztremortól szenvedett. Betegünk fiát 13 éves korában nyugtalan láb szindróma miatt vizsgálták. A rutin vérvizsgálat, a réz, a ferritin és a ceruloplazmin szint, valamint a hasi ultrahang is normális volt. Az agyi MRI (3T) nem mutatott strukturális vagy vascularis elváltozásokat, a basalis ganglionok normálisak voltak, de a fejskefajok jel hiányát észleltük (8. ábra), ami PD-re utal.

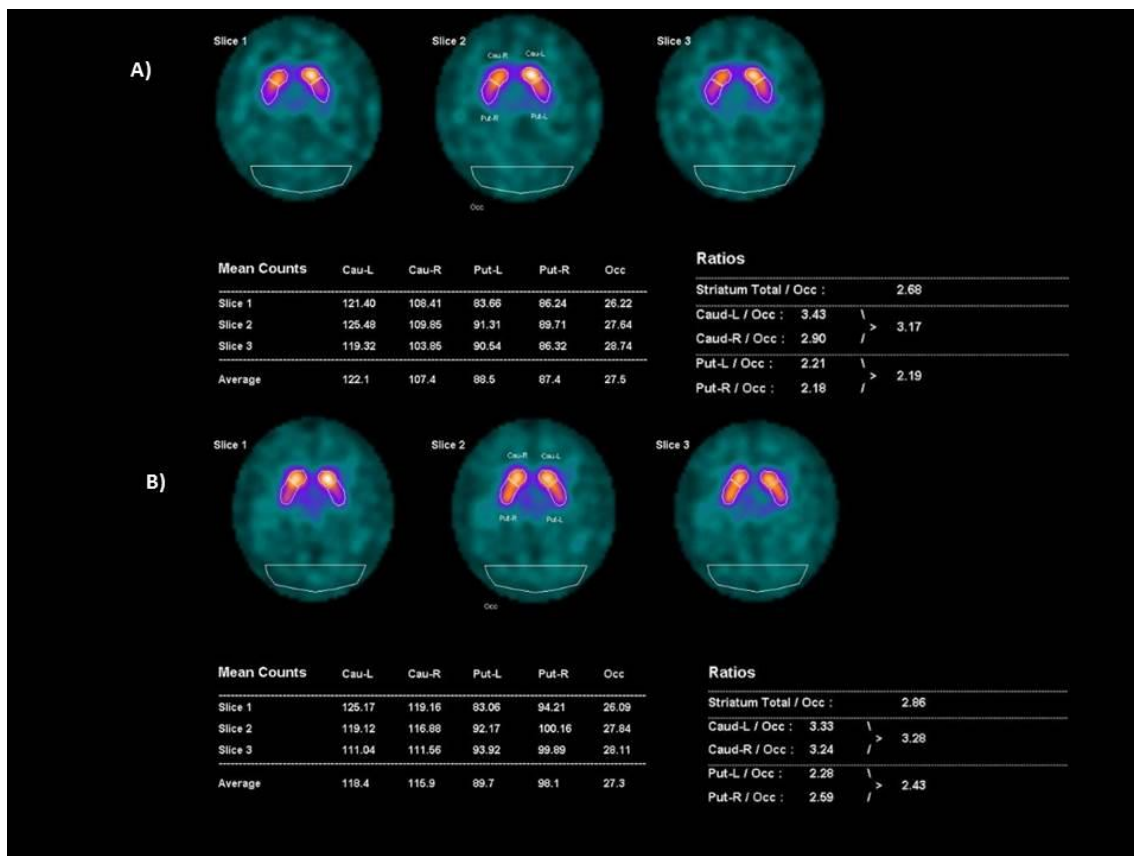


8. ábra A beteg agyi MRI felvétele

A mezeencephalon síkjában az axiális érzékenységgel súlyozott képeken a substantia nigra mind a két oldalon azonosítható. A fejskefajok jel normál esetben jelen van a 3T képalkotás során a nyilak által jelzett területen, de a betegben ez hiányzik.

Az eredmények további tisztázása érdekében DaTscan vizsgálatot végeztünk, egy kettős fejú SPECT rendszerrel (GE Infinia II Xeleris munkaállomással) az EANM irányelv [296] szerinti standard rögzítési protokoll alkalmazásával és 170 MBq I-123-Ioflupane nyomjelzővel. A vizsgálat során alkalmazott jelzőmolekula nemcsak a dopamin transzporterhez (DAT), hanem a szerotonin transzporterhez (SERT) és a norepinefrin transzporterhez (NET) is nagy affinitással képes kötődni [297]. Ugyanakkor a DAT koncentrációja a basalis ganglionokban sokkal magasabb, mint a többi transzporteré, ezért a mérések során kapott értékek megfeleltethetők a DAT mennyiségének. A striatális kapcsolódás mértékét, mind semikvantitatív vizuális értékeléssel, mind a pontosabb összehasonlítás céljából DaTQUANT szoftverrel (a GE Healthcare által 2013-ban létrehozott, 2015-ben adaptált, a bekötődést kvantitatívan meghatározó módszer) értékeltük [298]. A vizsgálat során a radiopharmakon aszimmetrikusan csökkent feldúsulását detektáltuk a jobb oldali nucleus caudatusban 3 órával az I-123-ioflupán intravénás beadása után (9/A ábra). A DaTscan ideje alatt a beteg nem számolt be kokainhasználatról. Habár a kokainhasználatról csak önbevallásos alapon győződünk meg, a beteg hosszú távú megfigyelése és szoros követése a beteg megfelelő együttműködésével, valamint a klinikai tünetek javulása meggyőzött bennünket az anamnesztikus adatok megbízhatóságáról.

Mivel a családban a tünetek halmozódása figyelhető meg a PD-vel leggyakrabban asszociált géneket megvizsgáltuk (*PRKN*, *PINK1*, *PARK7*, *LRRK2*, *SNCA*). Az *LRRK2* génben a S1647T homozigóta kockázati tényezőt azonosítottuk [231]. A szegregációs vizsgálat során a S1647T *LRRK2* variánst mindkét szülőben heterozigóta formában azonosítottuk. A klinikai és a DaTscan eredmények alapján olyan Parkinson-szindrómát feltételeztünk, mely egy toxikus környezeti tényező és a genetikai kockázati tényező együttes jelenlétéből fakad. Az ambulancián Selegilint írtunk fel neki, de a beteg elhagyta a gyógyszert, mert a remegés a gyógyszeres kezeléstől tovább rosszabbodott. Egy év kokain absztinencia után a remegés jelentősen csökkent. Másfél évvel az első DaTscan után ellenőrző vizsgálatot végeztünk, amely normál radiopharmakon dúsulást mutatott a striatumban, csak enyhe aszimmetriával. A jobb nucleus caudatus területén a radiopharmakon feldúsulása visszatért a normál tartományba, a jobb oldali striatum területén a dúsulás magasabb volt, mint az első vizsgálatnál (9/B ábra).



9. ábra A beteg DaTscan értéke a két vizsgálati időpontban:

Az ábra a radiopharmakon feldúsulását mutatja a basalis ganglionok területén. A méréseket és a számított arányokat a kérdéses mennyiségek elemzéséhez a táblázatok tartalmazzák. Az A) ábrát a beteg első vizsgálata után készítettük. Ebben az időben csökkent a radiopharmakon kötődés a jobb oldali striatumban (főleg a nucleus caudatus területén). A B) ábra egy év kokain absztinencia után került rögzítésre. Ebben az időpontban már normál kötődés mutatható ki a jobb oldali nucleus caudatusban.

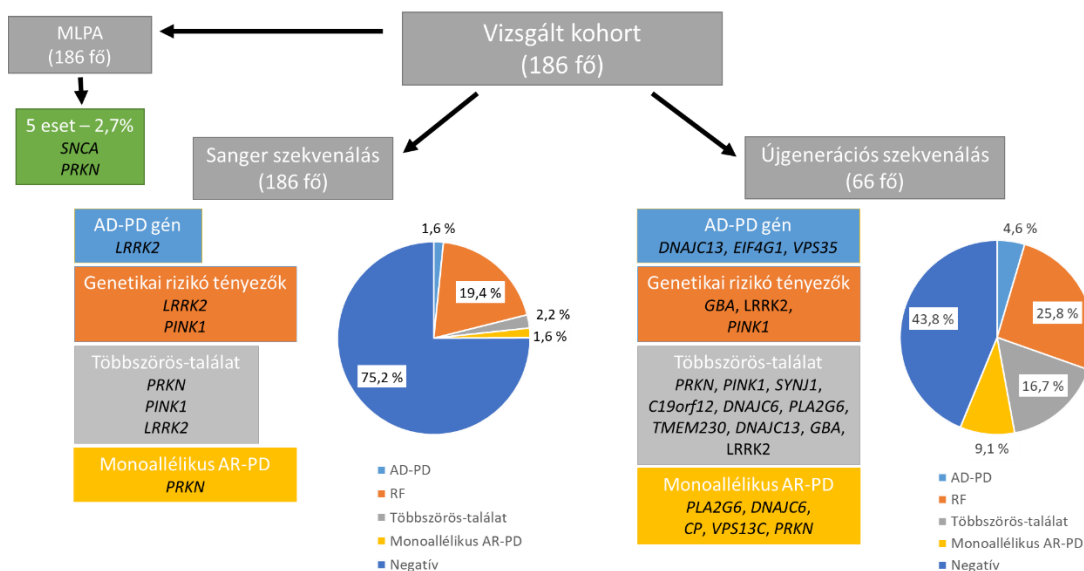
5 Megbeszélés

5.1 A Parkinsonizmus-asszociált gének variáns elemzése a PD kohortban

Kutatásunk elsőként célozta meg a PD kapcsolt gének ritka variánsainak vizsgálatát Magyarországon, mely segítségével a PD genetikai epidemiológiai adatait térképeztük fel. Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a leggyakoribbként ismert monogénes etiológia (*SNCA*, *LRRK2*, *PRKN*, *PINK1*, *PARK7*) csak a PD kis hányadában felelős a klinikai tünetekért (4,8%, 9 eset), így a hagyományos Sanger szekvenálás, az MLPA vizsgálattal kiegészítve sem a legköltséghatékonyabb diagnosztikai útvonal a PD genetikai vizsgálata során még FPD betegek esetében sem. A magyar PD betegek genetikai elemzése során olyan mutációkat azonosítottunk, amelyek eltérő asszociációs fokú géneket befolyásoltak (*C9orf72*, *C19orf12*, *CP*, *DNAJC6*, *DNAJC13*, *EIF4G1*, *GBA*, *LRRK2*, *PRKN*, *PINK1*, *PLA2G6*, *POLG*, *SNCA*, *SYNJ1*, *TMEM230*, *VPS13C* és *VPS35*). A génekben bekövetkezett eltérések a mitochondriális működés és az autofágia-alapú lebontási útvonal hibáin keresztül PD kialakulásához vezethetnek [54]. Fehérjetermékek funkciójának tanulmányozása tovább tisztázhatja a neurodegeneráció patomechanizmusában játszott szerepüket és a köztük fennálló kölcsönhatásokat.

Az MLPA elemzés 5 esetben azonosított patogén kópiaszám változást a vizsgált csoportban, míg Sanger-szekvenálással három esetben a *LRRK2* gén lehetséges káros mutációit detektáltuk, további 38 esetben írtunk le kockázati variánst a *PINK1* és a *LRRK2* génben (2 betegben mindkét génben azonosítottunk eltérés). Az együttesen előforduló variánsokat négy betegnél észleltük (2,2%). Három esetben heterozigóta *PRKN* eltérést detektáltunk (1,6%). Ezen felül 66 beteg NGS elemzése számos más PD-asszociált génben tárt fel potenciálisan káros eltéréseket (*CP*, *C19orf12*, *DNAJC6*, *DNAJC13*, *EIF4G1*, *GBA*, *PLA2G6*, *SYNJ1*, *VPS13C*, *VPS35*, *TMEM230*). Három beteg heterozigóta variánsokat hordozott AD-PD génekben (*DNAJC13*, *EIF4G1*, *VPS35*). A Sanger szekvenálás során azonosított rizikó faktorokhoz képest további hét betegben azonosítottunk egyedülként előforduló monoallélikus *GBA* aminosavcserét. A „többszörös-találat” mechanizmusát a Sanger szekvenálás során kapott eredményekhez képest további nyolc betegnél írtuk le. Ezekben az esetekben egy genetikai kockázati tényező vagy egy/kettő heterozigóta ritka variáns együttes jelenlétét tártuk fel PD-vel társított génekben (16,7%). A Sanger szekvenálás eredményeihez képest további négy esetben egyetlen heterozigóta mutációt írtunk le egy AR-PD génben (9,1%).

Összességében azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az NGS módszerrel jelentős mértékben növelhető a klinikailag releváns találatok száma (10. ábra).



10. ábra A különböző módszerekkel azonosított genetikai háttér megoszlása

Az ábrán a színes dobozokban az egyes csoportokban azonosított gének szerepelnek. A kördiagramm szemlélteti, hogy a Sanger-, illetve az újgenerációs szekvenálás után a vizsgált betegek hány százaléka került a jelölt csoportokba.

Rövidítésjegyzék: MLPA: multiplex ligáció-függő próba amplifikáció, AD-PD: autoszomális dominánsan öröklődő Parkinson-kórral asszociált gének, AR-PD: autoszomális recesszíven öröklődő Parkinson-kórral asszociált gének, RF: rizikó faktor, P: patogén, D: káros, SNCA: alpha-synuclein, PRKN: parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, LRRK2: leucin rich repeat kinase 2, DNAJC13: DNAJ subfamily C member 13, EIF4G1: eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1, VPS35: vacuolar protein sorting 35, PINK1: PTEN-induced kinase, GBA: glucocerebrosidase, C19orf12: chromosome 19 open reading frame 12, SYNJ1: synaptojanin-1, DNAJC6: DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6, PLA2G6: phospholipase A2 group 6, TMEM230: transmembrane protein 230, CP: ceruloplasmin, VPS13C: vacuolar protein sorting 13 homolog C.

5.1.1 Az azonosított kópiaszám eltérések és szerepük a rutin diagnosztikában

A vizsgált esetek közül öt betegnél azonosítottunk a *PRKN* vagy a *SNCA* génben nagyobb kópiaszám eltérést (copy number variation, CNV). Az egy vagy több exont érintő deléciók és duplikációk/triplikációk jelentős hányadot képviselnek a *PRKN* gén esetében [299]. Egy holland kohortban a haplotípus és a közös töréspontok elemzése alapján alapító mutációként írták le az exon 7 duplikációját [154]. A CNV-k fontosságát a *PRKN* génben eredményeink is alátámasztották, mivel a megoldott esetek (akár oligogénes, akár AD öröklődésnek megfelelő pozitív eseteket számolva) 17,4%-a *PRKN* exon átrendeződést hordozott. Ez a típusú eltérés feltételezhetően ártalmasabb, mert megváltoztatja a parkin fehérje működését azáltal, hogy átrendezi a fehérje struktúráját [300]. Ezek a megállapítások azt sugallják, hogy a leggyakrabban érintett génekben a CNV-k vizsgálata a PD diagnosztizálásának rutin klinikai gyakorlatában költséghatékony lehet. Vagyis elmondható, hogy a CNV-eket első lépésként kellene vizsgálni, amennyiben a klinikus fontolóra veszi a genetikai meghatározottság lehetőségét. Ezért intézetünkben megváltoztattuk a klinikai genetikai diagnosztikai útvonalat és első lépésben minden beteg DNS mintáját MLPA módszerrel elemezzük.

5.1.2 Korábban már PD-vel asszociált genetikai rizikó variánsok

A PD kockázati tényezői a *GBA*, a *LRRK2* és a *PINK1* génekben viszonylag gyakoriak voltak a mi kohortunkban. Ezek a variánsok klinikai szempontból jelentősek lehetnek, mivel néhányuk fontos tényezőként szerepet játszhat a klinikai vizsgálatok starifikálásában (pl. a *GBA* gén esetében), míg mások módosító szerepet játszhatnak a betegség komplex etiológiájában. Érdekes, hogy az S1647T *LRRK2* variáns, amely homozigóta állapotban egy PD kockázati tényező, hasonlóan magas gyakorisággal volt jelen mind a magyar, mind a kínai PD betegekben (14,5%, illetve 24,4%) [231]. Ez az eredmény jól korrelál korábbi adatainkkal, amelyek egy kelet-ázsiai populációspecifikus marker jelenlétét mutatták ki a magyar népességben [301].

Sparato és mtsai (2017) hipotézise szerint azok a gének amelyek mind a mendeli rendellenességek kóroki mutációit, mind a komplex betegségek rizikó variánsait hordozzák nagy funkcionális jelentőséggel bírhatnak a betegségek patogenezisében [302]. Ez arra utal, hogy a mendeli rendellenességekhez kapcsolódó gének genetikai variációi fontos szerepet játszhatnak a komplex betegségek iránti fogékonyság

növelésében. Kohortunkban a genetikai kockázati variánsok irodalomhoz hasonló gyakoriságát figyeltük meg [2]. A jövőben terápiás beavatkozást lehetne tervezni néhány genetikai kockázati variáns alapján, hasonlóan a *GBA* génhez kapcsolódó PD esetében alkalmazott glükozil-ceramid-szintáz (GCS) gátlását vizsgáló klinikai vizsgálatokhoz [303].

5.1.3 „Többszörös-találat” mechanizmus és szerepe a PD-re való fogékonyságban

A saját és más kutatócsoportok megfigyelése alapján [304, 305], több mint egy ritka variáns azonosításának a lehetősége NGS technológiával egy PD betegnél nem egyedi esemény. Esetünkben akkor feltételeztük a „többszörös-találat” hatását, ha a betegnek egynél több eltérése volt (akár ritka káros, akár gyakori kockázati variáns) különböző PD-vel társított génekben. Ezek a megfigyelések tudományos szempontból érdekesek, azonban nehéz az egyénnek ilyen esetben genetikai tanácsot adni. Kohortunkban 12 esetben mutattunk ki lehetséges „többszörös-találat” mechanizmust a PD tünetek hátterében, ebből kilenc esetben pozitív volt a családi anamnézis (5. táblázat). Az azonosított kockázati variánsok együttes jelenléte az AR-PD-vel társított gének ritka, káros variánsaival felvetette annak a lehetőségét, hogy a betegek korábban megjelenő tüneteit a „többszörös-találat” mechanizmusa magyarázhatja. A kockázati variánsok módosító hatásainak további elemzése, különösen ha recesszíven öröklődő heterozigóta ritka káros mutációval társul, segíthet a PD prognózis pontosabb előrejelzésében. Korlátozza az eredmények értelmezhetőségét a párhuzamosan létező genetikai kockázati tényezők eltérő penetranciája is. Tovább árnyalhatná a képet, ha egyetértés születne a kutatók között abban, hogy a *GBA*-t monogénes kóroki vagy inkább kockázati tényezőként (az alacsony életkorhoz kapcsolódó penetrancia miatt) kellene klasszifikálni. Példaként említhetjük a N409S *GBA* variánst, amelynek becsült penetranciája 6-14% minden populációban. De magasabb penetranciáról számoltak be a súlyosabb *GBA* variánsok esetében, amelyek becsült penetranciája megközelíti a *LRRK2* variánsokét [243, 244]. Irodalmi adatok alapján a *LRRK2* gén variánsainak becsült penetranciája valószínűleg a variáns génen belüli elhelyezkedésével függ össze [86]. Ezért fontos, hogy ezeket a tesztek megismételjük egy jóval nagyobb kohortban is.

Az oligogénes hatás statisztikai alátámasztása érdekében két hipotézist teszteltünk. Megvizsgáltuk, hogy azok az EO betegek, akik egyidejűleg egynél több PD-asszociált

variánst hordoznak korábban induló tünetekkel rendelkeznek-e. Megfigyeltünk egy tendenciát, ez azonban statisztikailag nem volt szignifikáns (4/A ábra). A második kérdés az volt, hogy vajon azoknál a betegeknél, akiknél PD-t diagnosztizáltak, gyakrabban fordulnak-e elő variánsok PD-asszociált génekben, mint más neurodegeneratív betegségben szenvedő betegek vagy a kontrollok esetében. Meglepő módon megfigyeltük, hogy több ritka variáns volt jelen a kontroll csoportban, ha megengedő szűrési kritériumokat definiáltunk, de ez a különbség szigorúbb szűrési kritériumok felhasználásával csökkent. Amikor a legszigorúbb szűrési kritériumot alkalmaztuk, akkor úgy tűnt, hogy ez a tendencia megfordul, habár statisztikailag ez nem volt szignifikáns (4/B ábra). Ezenkívül, megfigyeltük azt a potenciális tendenciát is a csoportunkban, hogy azoknak a betegeknél, akiknek több variánsa van, nagyobb eséllyel kerülnek a familiáris csoportba a besorolás során. Összefoglalva elmondható, hogy az oligogénes hatás gyanúját az eredményeink alapján feltételezzük, azonban egy sokkal nagyobb kohorra lenne szükségünk ahhoz, hogy az oligogénes hatást bizonyíthassuk.

Figyelembe kell vennünk a statisztikai összehasonlítás korlátait, amely egyrészt az esetek kis számából (66 esetben volt NGS adatunk), másrészt a lehetséges egyéb genetikai faktorok meglétéből fakad. Az utóbbi esetenél még a teljes exom analízis esetén sem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy olyan exonokon kívüli régióban vagy olyan típusú kóroki eltérések okozzák a tüneteket, amelyeket ezekkel a módszerekkel nem tudtunk lefedni. A célzott szekvenálás esetén pedig a nem vizsgált génekben előforduló lehetséges patogén eltérések sem zárhatók ki.

5.1.4 Monoallélikus heterozigóta variáns AR-PD-vel társított génekben

Vizsgálatunkban hét esetben azonosítottunk monoallélikus, ritka, káros, heterozigóta mutációt AR-PD génekben (6. táblázat), amelyek potenciális szerepet játszhatnak a PD patogenezisében [306, 307]. Korábbi tanulmányok azt sugallták, hogy a sporadikus EOPD-betegek kb. 5–10% -a heterozigóta mutációt hordoz AR-PD-vel társított génekben [156, 308]. Kohortunkban hasonló eloszlást (Sanger – 4,3%, NGS – 17,2%) észleltünk. De továbbra is vita tárgyát képezi, hogy a recesszív gének heterozigóta variánsai hogyan járulhatnak hozzá az EOPD kialakulásához. Egyrészt, néhány tanulmány szerint egy heterozigóta mutáció nem elegendő és egy másik mutációra van szükség a PD kialakulásához [309–311]. Másrészt, néhány eredmény alapján a heterozigóta mutációk

haploinsufficiencia révén PD-t okozhatnak, de a domináns-negatív vagy a toxikus hatást sem lehet kizárni [156, 160, 312]. További eredmények azt mutatták, hogy a heterozigóta mutációk vagy sejtszintű szubklinikai diszfunkciót eredményeznek, vagy hajlamosítanak a PD kialakulására [156, 160, 312]. Ezenkívül a korábban leírt mutációk hibás működést okozhatnak a striatum dopamin anyagcseréjében és megváltoztathatják az agyi hálózat struktúráját, ami kognitív károsodáshoz vezethet [234, 307, 313–315].

A *PRKN* és a *PINK1* génekben az egyes heterozigóta mutációk kisebb genetikai kockázati tényezőknél tekinthetők a PD kialakulása szempontjából. Például a *PRKN* heterozigóta mutációi zavarokat okozhatnak a striatum dopamin metabolizmusában [313], továbbá ezt a típusú eltérést már korábban is összefüggésbe hozták sporadikus LOPD-vel [72]. A mi betegeink közül is két késői kezdetű esetben *PRKN* heterozigóta, káros variánst azonosítottunk. Mivel a *VPS13C* mutációi mitochondriális diszfunkciót és *PINK1/PRKN*-függő mitofágia növekedést eredményeznek [180], ez a kapcsolat azt sugallja, hogy a heterozigóta eltérései hasonló következményekkel járhatnak, mint a *PRKN* és a *PINK1* gének esetében. A *PLA2G6* heterozigóta mutációi szintén hozzájárulhatnak a PD kialakulásához [306], mivel bizonyos *PLA2G6* heterozigóta mutációkat már PD-vel érintett betegekben is azonosítottak [316, 317]. Feltételezzük, hogy az I898M káros mutáció a *CP* génben, amely fontos szerepet játszik az agy vas- és réz-anyagcseréjében [287], fokozhatja a PD kialakulásának kockázatát.

A 6. táblázatban bemutatott négy korai kezdetű beteg átlagos AOO-ja ($42 \pm 5,72$ év) inkább hasonlít a 4. táblázatban bemutatott, egyetlen genetikai kockázati variánst hordozó sporadikus betegek átlagos AAO-értékéhez ($40 \pm 6,94$ év), mint a potenciálisan oligogénes háttérű sporadikus EOPD betegekhez (5. táblázat, átlagos AOO: $34,5 \pm 4,95$ év). Az AR-PD-asszociált gének mutációinak vizsgálata elengedhetetlen lehet a heterozigóta mutációk szerepének pontosabb tisztázásához az EOPD-s betegekben.

Egyetértünk Kleinnel és Westenberggerrel abban, hogy a csökkent penetrancia, a változó expresszivitás és a különféle fenokópiák/genokópiák nehezebben azonosíthatók, ha a beteg pozitív családi kórtörténettel rendelkezik. Vannak családok, ahol az inkomplett penetrancia, vagy a nagyon enyhe, vagy a klinikailag megkülönböztethetetlen fenotípus miatt, bizonyos családok esetében a betegséget hibásan sorolják be AR-öröklésmentbe [318]. Jövőbeni tanulmányoknak kell megválaszolniuk azt a kérdést, hogy vajon ezek a variánsok potenciális AD-PD-indukáló mutációkként, vagy inkább kockázati

tényezőkként a genetikai fogékonysággal és a környezeti hatásokkal együttesen felelősek a kialakuló fenotípusért. A monoallélikus variánsok szerepének feltárása az AR-PD-ben döntő jelentőségű lehet a genetikai adatok jövőbeli felhasználása szempontjából, a genetikai tanácsadás javítása érdekében a személyre szabott megközelítés során.

5.2 A *POLG*, mint nukleáris mitochondriális gén szerepe a Parkinson-kórban

A mitochondriális *POLG* hibás működése rendkívül széles fenotípus spektrumot okozhat, egyrésztől súlyos, progresszív, multisisztémás betegséget, vagyis a klasszikus *POLG*-asszociált mendeli kórképeket eredményezhet. Másrésztől egyre nagyobb számban azonosítanak heterozigóta *POLG* mutációt nem klasszikus mitochondriális betegségek hátterében is, mint pl. a Parkinsonizmus és a korai menopauza [219]. A sporadikus és iPD patogenezisének hátterében már régóta ismert a mitochondriális diszfunkció szerepe [319]. Bizonyos esetekben a mitochondriális DNS elsődleges genetikai hibája, míg jóval gyakoribb esetben a *POLG* gén mutációjának okaként, másodlagosan keletkezett átrendeződések direkt módon okozhatnak Parkinsonizmust [319]. Kérdés továbbá, hogy a heterozigóta *POLG* mutáció major vagy minor hatású gén a Parkinsonizmus patogenezisében. Murgai és mtsai szerint a heterozigóta mutációk szubklinikai vagy enyhébb fenotípussal és későbbi indulással manifesztálódhatnak, feltételezhetően a különböző epigenetikai mechanizmusok következtében [224].

A 67, Parkinsonizmussal érintett beteg vizsgálata során három esetben azonosítottunk potenciális kóroki variánst a *POLG* gén esetében (4,5%). Annak ellenére, hogy egyre több gén kerül leírásra a primer mitochondriális génhibából fakadó PD-vel kapcsolatban (pl. *PRKN*, *PINK1* és *PARK7*), a sokarcú mitochondriális diszfunkciót okozó *POLG* gén mutációja a klinikai gyakorlatban csak ritkán merül fel a Parkinsonizmus hátterében. Ezzel szemben, már ebből a korlátozott esetszámú tanulmányból látható, hogy a *POLG* mutáció gyakorisága a Parkinsonizmusban szenvedő páciensek körében hasonlít az egyéb PD-vel asszociált gének mutációs gyakoriságához.

Az azonosított variánsok közül a T251I/P587L mutáció a negyedik leggyakoribb humán *POLG* eltérés [320]. A biokémiai vizsgálatok igazolták, hogy a T251I és a P587L variánsok közül az utóbbi károsabban hat a fehérje szerkezetére, és a T251I ezt szinergisztikusan befolyásolja súlyosan károsítva a katalitikus aktivitást [223]. Általában a leggyakoribb klinikai megjelenés a PEO, ptosisal vagy anélkül, és a másodlagos

klinikai tünetek közé tartozik az ataxia, myopathia, epilepszia, neuropathia és májbetegségek. Nem ritkán társulnak pszichiátriai tünetek is a *POLG* mutációkhoz. A tünetek megjelenésének ideje is nagyon változatos és nem figyeltek meg a nemmel összefüggő mintázatot sem [291]. Több, korábbi esetben felmerült ennek a összetett heterozigóta mutációnak az autoszomális domináns jellege [294, 321–323]. A 2. esetben leírt H613D eltérés az irodalomban eddig még nem került leírásra és a gnomAD adatbázisban sincs jelen. A variánst 8 predikciós algoritmus is károsnak ítélte és az ACMG klasszifikáció alapján valószínűsíthetően patogén besorolást kapott. Azonos pozícióban korábban leírt H613Y aminosavcserét heterozigóta formában azonosították egy férfi betegben, akinek a főbb tünetei a ptosis, myopathia, súlyos cerebellaris atrophia, dysarthria és enyhe kognitív hanyatlás volt [324]. A 3. esetben detektált G737R aminosavcserét eddig egy esetben írták le összetett heterozigóta formában, korai-kezdű Parkinsonizmussal diagnosztizált betegben [292]. Az eddig közölt esetekben jóval korábbi indulású volt a betegség, mint a mi páciensünk esetében [293].

A korábbi irodalmi adatok és a magyar populációban kapott eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a Parkinsonizmus differenciál diagnózisa során, az esetleges *POLG* genetikai érintettségét figyelembe kell venni. A negatív családi anamnézis sem zárja ki egyértelműen a mitochondriális betegség esélyét [319]. Továbbá fontos szem előtt tartani azt a lehetőséget is, hogy a többszörös *POLG* mutáción kívül egyéb tényezők is hozzájárulhatnak a klinikai kép manifesztálódásához, a betegség súlyosságát és a tünetek megjelenésének idejét befolyásolva. Ilyen módosító tényezők lehetnek egyéb nukleáris mitochondriális génekben bekövetkező mutációk, a megváltozó interakciók más mtDNS replikációban szerepet játszó fehérjékkel, az mtDNS heteroplazmia, az epigentikai faktorok és a gén-környezet interakciók.

5.3 A *C9orf72* előfordulási gyakorisága a magyar PD kohortban

Az utóbbi néhány évben, elsősorban az esettanulmányok, kibővítették a *C9orf72*-vel társuló, ALS vagy FTD nélküli Parkinson-szindrómák klinikai spektrumát [325, 326]. Ez az első olyan vizsgálat, amely a *C9orf72* GGGGCC hexanukleotid ismétlődés-feldúsulást (HIF) genotipizálta egy klinikailag diagnosztizált Parkinsonizmussal rendelkező magyar kohortban. Az általunk vizsgált csoportot alkotó 147, magyar, nem-rokon beteg

vizsgálata során két esetben (1,4%) patogén, 30-nál nagyobb ismétlődés-számot és 7,5%-ban 23 és 30 HIF közé eső intermedier esetet írtunk le.

A különböző ázsiai kohortok (Irán, Kína) vizsgálatánál sem pozitív, sem intermedier esetet nem regisztráltak [327]. Az egyetlen összefüggés, amit azonosítottak, az a HIF és a PD tünetek megjelenésének időpontja között volt jelen [328], a mi kohortunkban ilyen összefüggést nem találtunk (7. ábra). Két amerikai tanulmány közül csak az egyiknél találtak négy betegben a normálisnál nagyobb HIF-et: 21, 23, 24 és 38 ismétlődés, ez utóbbi viszont nem szegregált a vizsgált családban [329, 330], akárcsak a mi esetünkben. Egy szardíniai vizsgálatban négy intermedier esetet (20-29 HIF) társítottak PD-vel (pszichózissal vagy demenciával) és atípusos Parkinsonizmussal (demenciával vagy anélkül) [331]. Míg angol és francia PD kohortban három esetben patogén HIF-et azonosítottak [332]. További tanulmányokban 20–39 közötti HIF-ekről számoltak be PD-vel érintett betegekben [151, 329, 333, 334]. Érdekes módon egyik kontrollnál sem volt >23 ismétlődés [333]. Az intermedier expanszió a PD vagy a Parkinsonizmus kockázati tényezője lehet, ám az intermedier ismétlődés nem mindig szegregálódik a PD klinikummal [333, 334]. Mivel a klinikailag diagnosztizált PD 10-25%-ánál a boncoláskor eltérő diagnózis kerül megállapításra, a pozitív vagy intermedier *C9orf72* ismétlődések klinikailag diagnosztizált PD vagy Parkinsonizmus esetén a fenotípusos heterogenitásra vagy más neurodegeneratív rendellenességek meglétére utalhatnak [335]. Érdekes módon több tanulmány igazolta a PD vagy a Parkinsonizmus dúsulását a *C9orf72* expanszióval diagnosztizált ALS/FTD érintett családokban [152, 336–338]. Ezért feltételezhető, hogy a *C9orf72* HIF legalább részben magyarázza az ALS és a Parkinsonizmus között leírt összefüggést. Ez a megállapítás magyarázható azzal, ha az intermedier allél valóban egy „premutációs” allél az ALS szempontjából. Mivel az ALS sokkal ritkábban fordul elő, mint a PD, ezért nagyobb a valószínűsége, hogy a PD a ritkább ALS családokban figyelhető meg, mint fordítva. Bár az intermedier/pozitív esetek patomechanizmusának tisztázására irányuló kutatások még gyerekcipőben járnak, a kezdeti bizonyítékok arra utalnak, hogy a növekvő számú ismétlődéssel egyre instabilabbá válik a régió [339]. Az intermedier eseteknél kiszámíthatatlan, hogy a következő generációban a HIF növekedni vagy csökkenni fog, ezzel szemben a hosszabb ismétlődések száma többnyire növekszik [340]. Az intermedier esetek instabilitása lehetővé teszi egy olyan küszöbérték elérését, ahonnan már valószínűbb az ismétlődés-

szám növekedése, mint csökkenése. Fennáll annak a lehetősége is, hogy a különböző *C9orf72* HIF okozta betegségekben az intermedier, illetve a patogén ismétlődés-szám más-más. Összegezve, ezek az adatok arra utalnak, hogy a *C9orf72* ismétlődések nemcsak hozzájárulnak a PD/Parkinsonizmus kialakulásának fokozott kockázatához, hanem bizonyíték lehet a rendellenes RNS-metabolizmus fontos szerepére a PD patogenezisében [333]. További vizsgálatokra van szükség a *C9orf72* HIF szerepének tisztázásához a teljes PD populációban, és annak meghatározásához, hogy vannak-e egyéb, közös genetikai kockázati tényezők ezen neurodegeneratív rendellenességek között.

A vizsgálatunk alapján elmondható, hogy (1) a *C9orf72* ismétlődés expanziója ritkán fordul elő a klinikailag típusos PD-ben és egyéb Parkinsonizmusokban; (2) több *C9orf72* ismétlődés-expanziót mutató betegnél a Parkinsonizmus levodopa-reszponzív volt és csak kevés esetben jelent meg kognitív hanyatlás, és (3) nem minden *C9orf72* ismétlődés-expanziót hordozó betegnek volt pozitív a családi anamnézise.

5.4 A környezeti és a genetikai rizikó tényezők kölcsönhatása egy eset bemutatásán keresztül

A tartós kokainhasználat számos mozgászavart eredményez [257], mivel komplex hatása van a központi idegrendszerre. Az ilyen hatások kategorizálásának lehetséges módjai az időjellemzőkön alapulnak, vagyis az akut vagy krónikus használat folytán kialakult neurológiai komplikációk, vagy azon, hogy a beteg aktív felhasználó, korai vagy késői absztinens. A kokain fő akut farmakológiai hatása a dopamin (DA) visszavételének gátlása, amely megemeli a szinaptikus DA szintet. Jelenleg csak kevés információ áll rendelkezésre a kokain hatásáról a humán dopamin transzporter (DAT) expressziójára, és az állatkísérletekből származó adatok is időnként ellentmondásosak. Két, az irodalom által támogatott mechanizmus létezik, amelyekkel megpróbáltuk értelmezni az eredményeinket, azaz a DaTscanrel detektált alacsony DAT-kötést, amely később normalizálódott.

Egyrészt, a megnövekedett DA-szintre reagálva DAT-szint csökkenés zajlik le [341]. Ez a kompenzációs mechanizmus csökkenti az akut DA-emelkedést a kokain használatával összefüggésben. Viszont hosszú távon DA-hiányhoz vezet a nucleus caudatusban és a frontális cortexben, mivel mind a DA szintézis, mind az újbóli felvétel szükséges a

szinaptikus működéshez [342]. Az akut kokain absztinencia esetén a DAT elkezd felülszabályozódni, amit korábbi DaTscan tanulmányok is igazoltak [343]. Ez magyarázhatja eredményeinket, azaz a csökkent DAT-kötődést, amely később normalizálódott. Ebben az esetben azt feltételeztük, hogy a DaTscan-t egy olyan időablakban hajtottuk végre, amikor a DAT-szint még csökkent, azonban a beteg már absztinens volt. Az akut megvonási tünetek mint a pszichológiai problémák, a nyugtalanság és a tremor, a DA szint csökkenésének következtében jelentkeztek [344]. Azzal együtt, hogy a kokain hosszú távú használata következtében csökken a DAT szint, amely magyarázhatja a Parkinson-szerű tünetek megjelenését, az absztinencia során DA depléció is végbemegy. Más tanulmányok azonban azt sugallják, hogy a kokain növeli a DAT-expressziót, és a hosszabb ideig tartó absztinencia csökkenti a DAT szintet [259]. Ebben a forgatókönyvben feltételezhetjük, hogy azért láttunk csökkent DAT-kötést, mert a beteg már hosszú ideje absztinens, és ez a változás később az expresszió szintjén is normalizálódott.

Meg kell említeni, hogy a fent leírt mechanizmusok elméletek és a kokain idegrendszerre gyakorolt hatása nagyon összetett. Fontolóra kell vennünk a D2 receptor expressziójának változásait [345], és a dopaminerg szinaptikus terminálisok hosszú távú szerkezeti károsodását is [342]. A hatások lehetnek a dózistól és a készítménytől függők, ugyanis a neurológiai komplikációk gyakoribbak a kokain beszívható alkaloid formáinál, amelyek „crack” néven ismertek [346]. Az akut vérnyomás-emelkedés és az agyi érrendszeri görcsök szintén okozhatnak cerebrovascularis eseményeket, például akut ischaemiás stroke-ot vagy aneurysma-rupturát [347], de a kisebb szubklinikai ischaemiás események is okozhatnak szerkezeti károkat az agyban. A krónikus kokainhasználat fokozott, életkor függő temporális lebenyi corticalis atrophiat eredményez [348], és csökkenti a frontális fehérállományi összeköttetést [349], amit képalkotó vizsgálatokkal is igazoltak.

A kokainhasználat és a Parkinsonizmus összekapcsolása mindazonáltal bonyolult, és az irodalmi adatok is hiányosak. Egyrészt a szinaptikus DA szint akut emelkedése enyhítheti az „OFF” időszakokat a PD-ben szenvedő betegeknél [350]. Másrészt a krónikus használat sok esetben Parkinson-szerű jellemzőkkel társult több esettanulmányban [344], bár ezt nem igazolta a Callaghan és mtsai által közölt epidemiológiai tanulmány [351]. A fent leírt mechanizmus a másodlagos Parkinsonizmus farmakológiai, reverzibilis formájára utal a mi esetünkben. A Parkinsonizmus és a krónikus kokainhasználat között

azonban lehetséges további, nem farmakológiai kapcsolat is. A krónikus kokain expozíció az α -synuclein túlzott expresszióját váltja ki [264], amely akut védő mechanizmus lehet a fokozott oxidatív stressz ellen, de végül LB-k kialakulásához és gyors neurodegenerációhoz vezet. Ezenfelül a kokain fizikailag kötődik az α -synucleinhez is, ami káros konformációs változásokat okozhat [262]. Mindazonáltal nem valószínű, hogy ezek a változások visszafordítható patológiát okoznának a DaTscan-en.

A gyógyszer-indukált Parkinsonizmus (DIP, drug-induced parkinsonism) egyik kiváltó okaként ismeretesek a különböző dopaminreceptor-blokkoló szerek (DRBA, Dopamine receptor blocking agent). Fontos hangsúlyozni, hogy a DIP esetében a kóroki ágens visszavonását követően a betegség progressziója általában visszafordul. Habár a hosszú távú kokainhasználatnak nem ugyanaz a hatásmechanizmusa, mint a DRBA vegyületeknek, viszont ezekről már jól ismert, hogy Parkinsonizmust is kiválthatnak. Lim és munkatársai (2013) arról számoltak be, hogy a Parkinsonizmus a DRBA abbahagyása után több, mint hat hónapig fennmaradhat, és ezzel egyidejűleg a DaTscan normális striatális DAT kötődést mutat. Kilenc hónappal a DRBA abbahagyása után a Parkinsonizmus jelentősen javult a vizsgált betegekben, de nem szűnt meg teljesen [352]. Az a folyamat, amit számos DIP betegnél figyeltek meg, akiknél a DRBA abbahagyása után a tünetek továbbra is jelen voltak vagy idővel akár súlyosbodtak is, a PD egyidejű kialakulására utalhat. Elképzelhető, hogy a neuroleptikumok az érzékeny dopaminerg rendszerre gyakorolt lehetséges neurotoxikus hatásukon keresztül progresszív folyamatokhoz vezetnek [353]. További kérdés, hogy a személyes fogékonyság milyen szerepet játszik a folyamatban. A neuroleptikumoknak kitett, DIP vagy PD tüneteket mutató személyeken végzett további genomi vizsgálatok végül azonosíthatják a fennálló hajlam genetikai hátterét. Még ha a patomechanizmus nem is ugyanaz, a kokain által kiváltott Parkinsonizmus és a DIP esetében az egyedi érzékenység fontos tényező lehet. Esetünkben a PD-hez kapcsolódó géneket vizsgáltuk, mivel a beteg családjában gyakoriak a különböző mozgászavarok. Csak egy genetikai kockázati variánst fedeztünk fel, amelyet korábban PD-vel társítottak. A homozigóta *LRRK2* S1647T polimorfizmus enyhe asszociációt mutat a PD-vel, alacsony OR értékkel (kohortunkban az OR: 1,5; 95% CI: 0,75-2,97). Jelenlétében a Parkinsonizmus megjelenése nem valószínű, de hipotetikus bizonyos környezeti tényezők jelenlétében, amelyek befolyásolhatják a DA szintet megnyilvánulhat. Hasonló mechanizmust írt le Lin és mtsai. egy tajvani kohortban

[354], ahol az S1647T szubsztitúció csak akkor asszociált Parkinsonizmussal, ha a környezeti faktorokat is beillesztették a logisztikus regressziós modellbe. További tanulmányok a környezeti tényezők és a genetikai variánsok közötti szignifikáns interaktív hatásokra is utaltak [355]. Ilyen típusú kölcsönhatásra jól ismert példa a szerotonin transzporter bizonyos polimorfizmusa és a depresszió kapcsolata [356]. De egy hasonló asszociáció bizonyítása a kokain használat és a *LRRK2* S1647T polimorfizmus között túlmutat esettanulmányunk keretein. Érdekes, hogy betegünkben az MRI már mutatott bizonyos szerkezeti változásokat (a feckskefárok jel hiánya), jelezve a nigrostriatális út károsodását, és így a kokain akut farmakológiai hatása is megváltozhatott. A családi anamnézis (az apai kézremegés és a gyermek nyugtalan láb szindrómája) arra utal, hogy a páciensnél valószínűsíthető egyfajta nem farmakológiai kockázat megléte is.

Összegezve: ez az esettanulmány felveti a gén-környezet kölcsönhatás lehetőségét a beteg tüneteinek hátterében. Eredményeink azt sugallják, hogy a külső hatások némelyike részben visszafordítható lehet korai állapotban, mivel egy adott absztinens időszak után a beteg parkinsonos tünetei enyhültek. A betegnél azonban longitudinális követésre van szükség, mivel a kokain krónikus hatásainak és a *LRRK2* variáns additív hatásainak eredményeként a PD később ismét megjelenhet. Hipotézisünk alátámasztása érdekében szükséges lenne a S1647T szubsztitúció és a környezeti tényezők kölcsönhatásának további tanulmányozására egy nagyobb magyar kohortban, és funkcionális tanulmányok kivitelezésére in vivo modellekben.

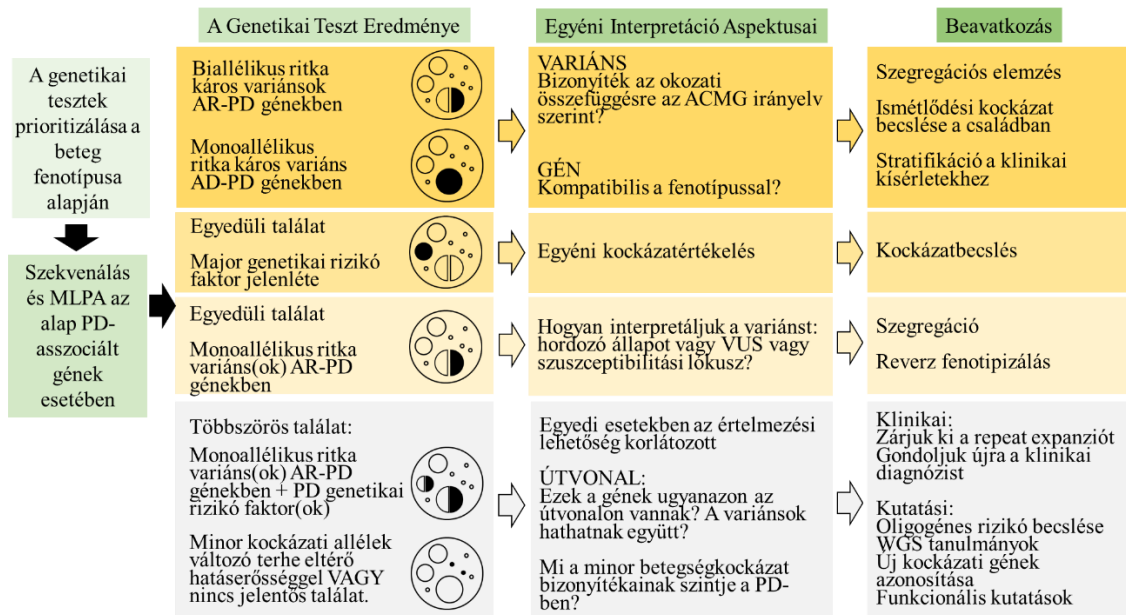
5.5 A genetikai tanácsadás nehézségei – differenciáldiagnosztikai értelmezés

A Parkinsonizmus differenciáldiagnosztikája kihívást jelenthet a klinikusok számára a heterogén fenotípusok, a kapcsolódó komorbiditások és a specifikus biomarkerek hiánya miatt [34]. Következésképpen a Parkinsonizmus különböző formái utánozhatják az iPD-t, ezzel megnehezítve a klinikai diagnózis felállítását. Mostanáig több gént kapcsoltak a különböző fenotípusú PD specifikus formáihoz, elősegítve a különféle PD formák klinikai megkülönböztetését. Fontos hangsúlyozni, hogy még ezeknek az adott géneknek az eltérő variánsai is megváltoztathatják a klinikai fenotípust, amely így jelentősen különbözni fog az iPD-től [357]. Ezenkívül más mozgászavarok is utánozhatják a PD

fenotípust, ami szintén nehezebbé teheti a megfelelő diagnózis felállítását genetikai vizsgálat nélkül.

A PD genetikai vizsgálata összetett, és többek között attól függ, hogy a tesztelt egyén olyan személy, akinek PD tünetei vannak, vagy olyan személy, akinek a családi kórtörténete pozitív PD-re, de neki még nincs PD tünete. A komplexitás abból fakad, hogy számos gén és kockázati tényező kapcsolódik a PD kialakulásához. Bizonyos gének esetében további vizsgálatokra van szükség, amelyek képesek megerősíteni az adott gén vagy variáns kapcsolatát a PD fenotípussal [40]. Noha ezek a gének megjelenhetnek a PD-ben szenvedő egyéneknél a többgének panelek esetében, jelenleg még csak limitált mértékben használhatók fel a klinikai gyakorlatban. Továbbá sok betegnél még akkor is, ha pozitív a családi PD anamnézis, a betegséget okozó rendellenes gén nem azonosítható. A genetikai tanácsadás különös kihívást jelent azokban az esetekben, amikor (1) több genetikai kockázati tényező, vagy (2) egy patogén vagy valószínűleg patogén mutáció heterozigóta hordozói státusza és egy genetikai kockázati tényező egymás mellett van jelen a vizsgált személyben (11. ábra). A párhuzamosan létező ritka variánsok szegregációs elemzése megkönnyítheti a szerepük tisztázását. A *GBA* variánsok különös jelentőséggel bírhatnak. Az eddig közölt eredmények alapján úgy tűnik, hogy azok a variánsok, amelyek jobban károsítják a fehérjét, még heterozigóta állapotban is, nagyobb hatással vannak a betegség kialakulására és progressziójára [358].

Még bonyolultabb a helyzet, ha a vizsgált személynek monoallélikus káros, ritka variánsa van AR-PD génben. Azokban az esetekben, amikor egyidejűleg léteznek monoallélikus ritka patogén variánsok és olyan génekben történnek változások, amelyek potenciálisan növelhetik a PD kialakulásának esélyét, vagy ezekben a génekben egynél több ritka variáns van jelen, a betegség kialakulásának kockázata nagyobb. Fontos továbbá kiemelni azokat a további gén-gén kölcsönhatásokat, és a környezeti tényezőket, amelyek szintén befolyásolják a genetikai háttér megnyilvánulását. Bizonyos esetekben, a korábban PD-vel társított génben a csökkent penetrancia miatt a kóroki eltérés nem okoz PD-t az egyén élete során. Ezenkívül alapvető fontosságú, hogy a klinikai genetikus ismerje az összes megkülönböztető fenotípusos tulajdonságot, amelyek a különböző PD-asszociált génekhez kapcsolódhatnak (1. és 2. táblázat, pl. *GBA*, *DNAJC6*, *SYNJ1*), mivel bizonyos esetekben, ahol valószínűleg patogén vagy bizonytalan jelentőségű variánst azonosítanak PD-asszociált génben a reverz fenotipizálás fontos feladat (11. ábra).



11. ábra A genetikai teszt eredményeinek klinikai értelmezése és a genetikai tanácsadáshoz kapcsolódó feladatok

Az első oszlop a PD-genetikai teszt elvégzése után felmerülő leggyakoribb eredményeket mutatja be. Fentről lefelé haladva a könnyebben értelmezhető megállapításoktól az egyre nagyobb kihívást jelentő találatokig jutunk. Az egyes szinteken a genetikai lelet szempontjait a genetikai tanácsadónak kell értelmeznie. Itt csak a szinttel kapcsolatos legfontosabb kérdéseket vettettük fel. Az utolsó oszlopban a klinikai genetikusok adott szinttel kapcsolatos legfontosabb feladatait szerepeltettük. Mindazonáltal fontos hangsúlyozni, hogy minden szinten nagyon komplex megközelítésre van szükség.

Rövidítésjegyzék: MLPA: multiplex ligáció-függő próba amplifikáció, PD: Parkinson-kór, AR-PD: autoszomális recesszíven öröklődő Parkinson-kór, AD-PD: autoszomális dominánsan öröklődő Parkinson-kór, ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics, VUS: bizonytalan jelentőségű variáns, WGS: teljes genom szekvenálás.

Kohortunkban nemcsak a *GBA* mutációt hordozó PD esetekben voltak jelen megkülönböztető klinikai jellemzők, hanem a heterozigóta *PLA2G6* variánssal (P9) rendelkező betegek esetében is. A P9 páciensnél leírtak hallucinációkat, alsó végtagi proximális gyengeséget, spasticitást, inkontinenciát (6. táblázat). Az MRI súlyos fehérállományi laesiókat mutatott. Korai kognitív diszfunkció volt egy olyan betegnél (P22), aki heterozigóta variánsokat hordozott a *SYNJ1* és *LRRK2*-ben (5. táblázat). Ennek

a betegek a korai és súlyos gyógyszeres kezeléssel asszociáló motoros fluktuációja és gyakori OFF-dystoniája is volt. Korai és súlyos orthostaticus hypotensio volt jelen a heterozigóta *C19orf12* variánssal rendelkező P4 betegen (5. táblázat). Egy olyan betegnél, aki heterozigóta *CP* variánst (P27) hordozott, alacsony volt a szérumban ceruloplasmin szint. Az összes ilyen típusú klinikai tünet megfigyelése és összegyűjtése nagyon fontos a genotípus-fenotípus korrelációk jobb megértéséhez a PD-vel érintett betegek esetében.

Habár még nem sok bizonyíték létezik a *C9orf72* expansió gyakoriságára a PD betegek és az igazolt α -synucleinopathiák esetén, a *C9orf72*-höz kapcsolódó ALS-esetekben bizonyított a substantia nigra területén fellépő neurodegeneráció [359]. Annak ellenére, hogy a *C9orf72* HIF nem okoz klasszikus PD-t, lehetséges, hogy a *C9orf72*-expansióval járó neuropatológia befolyásolhatja a SN-t és Parkinsonizmust okozhat [360]. Ennek értelmében a *C9orf72* expansió több agyi területet érinthet, amelyek eltérő klinikai következményekhez vezethetnek [150]. Ennélfogva a *C9orf72* mutációk genetikai vizsgálatát atípusos Parkinsonizmus és ALS/FTD pozitív családi anamnézis jelenlétében mérlegelni kell [360]. Továbbá a kombinált motoneuron és extrapiramidális tünetekkel rendelkező személyeket HIF-re kell szűrni, függetlenül a családi anamnézistől [361]. Annak megértése, hogy a *C9orf72* expansió mind az ALS, mind a Parkinsonizmus genokópia oka lehet, valószínűleg döntő jelentőségű a Parkinsonizmussal küzdő betegek tanácsadásában és kezelésében, különösen, ha családjukban előfordult ALS vagy PD.

A jelen tanulmány arra utal, hogy a Parkinsonizmusban szenvedő betegek 10,2%-ánál nagyobb a HIF-érték a *C9orf72* génben, mint 23, ez azt sugallja, hogy a PD vagy más Parkinson szindrómás betegeknél ellenőrizni kell a *C9orf72* HIF-et. A pozitív/intermediár esetek jelenléte hasonló a sporadikus és a familiáris csoportban (8,2%, illetve 10,2%). Ezáltal a potenciális hordozók korán azonosíthatók, aminek jelentős következményei lehetnek a genetikai tanácsadás szempontjából. A *C9orf72* expansióval kapcsolatban a diagnosztikai munka során fontos szem előtt tartani az alábbi tényezőket: inkomplett penetrancia, komplex genotípus-fenotípus összefüggés, széles körű és átfedő klinikai tünetek, kezelésekre adott eltérő válaszok és különböző lehetséges prognózisok [360].

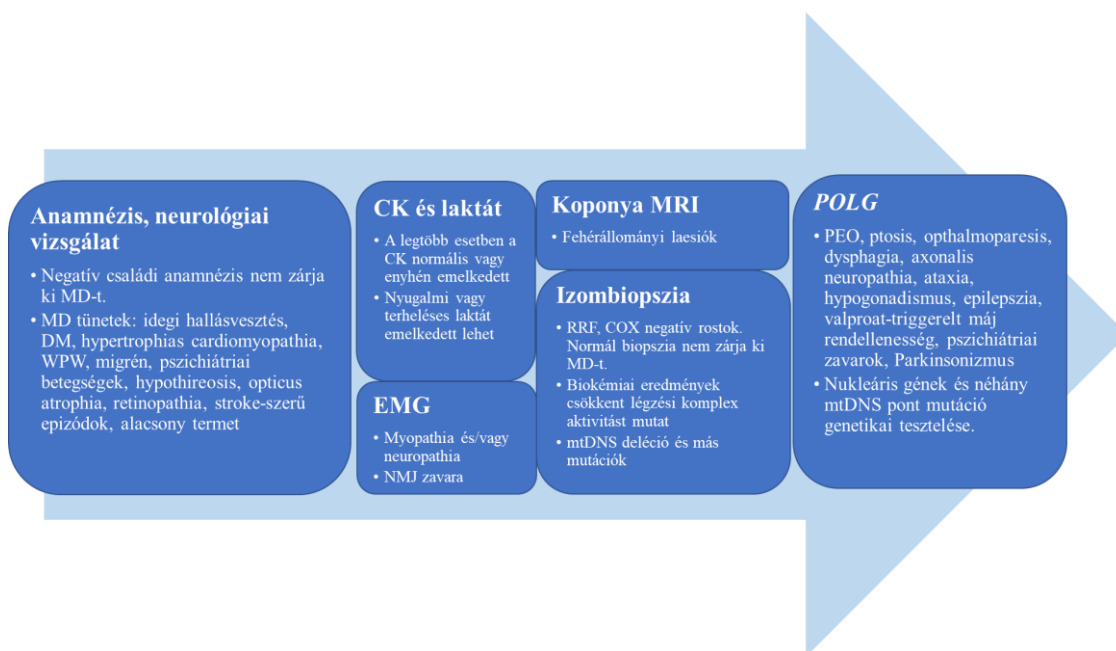
A klinikai gyakorlatban fontos szerep juthat a *C9orf72* HIF detektálásának a családtervezés és a potenciális génterápiák fejlődése miatt. Ezért azt javasoljuk, hogy minden olyan PD-s és egyéb Parkinsonizmusban szenvedő beteget, akinek családi

kórtörténetében van példa egyéb neurodegeneratív betegségre, vizsgáljunk *C9orf72* HIF-re. Mivel sok esetben a betegek nem tudnak kielégítő felvilágosítást adni a családi kórtörténetükről, és egy HIF vizsgálat egy több gént magában foglaló szekvenáláshoz képest nagyságrendekkel olcsóbb, érdemes minden esetben elvégezni a szűrést. A *C9orf72* HIF előzetes szűrése hozzájárulhat a *C9orf72* neurodegeneratív betegek megkülönböztetéséhez azoktól, akiknél típusosabb PD alakul ki. Azonban további kutatások szükségesek, hogy a betegek és családtagjaik számára a kapott eredmény szerepét megfelelően tudjuk értelmezni.

A Parkinsonizmus és a *POLG* mutációk együttes jelenléte az általunk vizsgált betegekben arra utalhat, hogy bizonyos esetekben a *POLG* hibája a Parkinsonizmus monogénes oka is lehet. Ennek az összefüggésnek a kihangsúlyozása klinikai szempontból is jelentős lehet, különösen a mozgászavarok diagnózisában. Az izomgyengeséggel járó PEO és a neuropathia elfedheti a Parkinsonizmus tüneteit, és a klinikusoknak különös figyelmet kell fordítaniuk a betegek Parkinsonizmusának észrevételére és kezelésére. PD-ben szenvedő pácienseknél ritkán előfordulhatnak olyan tünetek, amelyek *POLG*-asszociált mitochondriális betegségre utalhatnak, mint például a ptosis, a myopathia és a neuropathia [319]. A mitochondriális Parkinsonizmusnak jelenlegi tudásunk szerint nincs megkülönböztető jele, amely lehetővé tenné az azonnali diagnózist, és a negatív családi anamnézist sem tekinthetjük kizáró kritériumnak [319]. Az egyes tünetek azonban segítséget nyújthatnak.

A *POLG*-asszociált Parkinsonizmusról általánosságban elmondható, hogy a tünetek 50 éves kor körül jelennek meg, csökken a dopamin felvétel a striatumban és általában jól reagálnak levodopa vagy dopamin agonistára [362], ez a mi betegeink esetén is igaz volt. Ezen kívül sok esetben levodopa-indukált dyskinesis és motoros fluktuáció is megfigyelhető, amely szintén azonosítható volt betegeinknél is [363]. A szemmozgás zavara, a koponya MRI, a pszichiátriai komorbiditás, a neuromuscularis junctio zavara, a neuropathia és a fehérállományi laesio is felvetheti a *POLG* szerepét a betegség patomechanizmusában. Ilyen esetekben, ha a genetikai érintettség lehetősége is felvetődik a Parkinsonizmus tüneteit mutató betegnél, a *POLG* gén szekvenálását is meg kell fontolni. Továbbá az izomgyengeséggel járó PEO, a neuromuscularis junctio zavar és a neuropathia a Parkinsonizmus tüneteivel keverten jelentkezve a beteg gyógyszeres

kezelésének módosítását teheti szükségessé. A 12. ábrán a *POLG*-asszociált Parkinsonizmus lehetséges diagnosztikai megközelítését foglaltuk össze.



12. ábra A *POLG*-asszociált Parkinsonizmus diagnosztikai megközelítése

A mitochondriális rendellenességek lehetséges diagnosztikai útját ábrázoljuk Parkinsonizmussal érintett páciensek esetében. Annak ellenére, hogy az ábra egy folyamatot sugall, a valódi diagnosztikai út a beteg konkrét klinikai megjelenésétől függ, és nem egy mereven meghatározott folyamat. A *POLG*-val kapcsolatos rendellenességek esetében piros zászló lehet a Parkinson-kórral küzdő betegek/családok esetében, ha a fent felsorolt tünetek közül valamelyik jelen van [319].

Rövidítésjegyzék: MD: mitochondriális rendellenességek, DM: diabetes mellitus, WPW: Wolff-Parkinson-White szindróma, CK: kreatin-kináz, EMG elektromyographia, NMJ: neuromuscularis junctio, MRI: mágneses rezonancia képalkotás, RRF rongyos vörös rost, COX: citokróm c oxidáz, mtDNS: mitochondriális DNS, *POLG*: DNA polymerase gamma, catalytic subunit, PEO: progresszív externális ophthalmoplegia.

A genetikai háttér azonosítása nem csak a családtervezésben fontos, hanem a személyre szabott gyógyászat korszakában egyre inkább szükség van a betegek genetikai háttere alapján elvégzett stratifikálásra. Vannak olyan klinikai vizsgálatok, amelyek bizonyos genetikai változásokkal, például heterozigóta *GBA* variánsokkal, rendelkező betegek

kezelésére összpontosítanak. Ideális esetben a személyre szabott terápiás beavatkozás elérése érdekében a jövőben optimális lenne a többdimenziós klinikai és genetikai/genomikai kockázatbecslés, valamint a progressziós profil elemzésekor a rendszerbiológiai megközelítés.

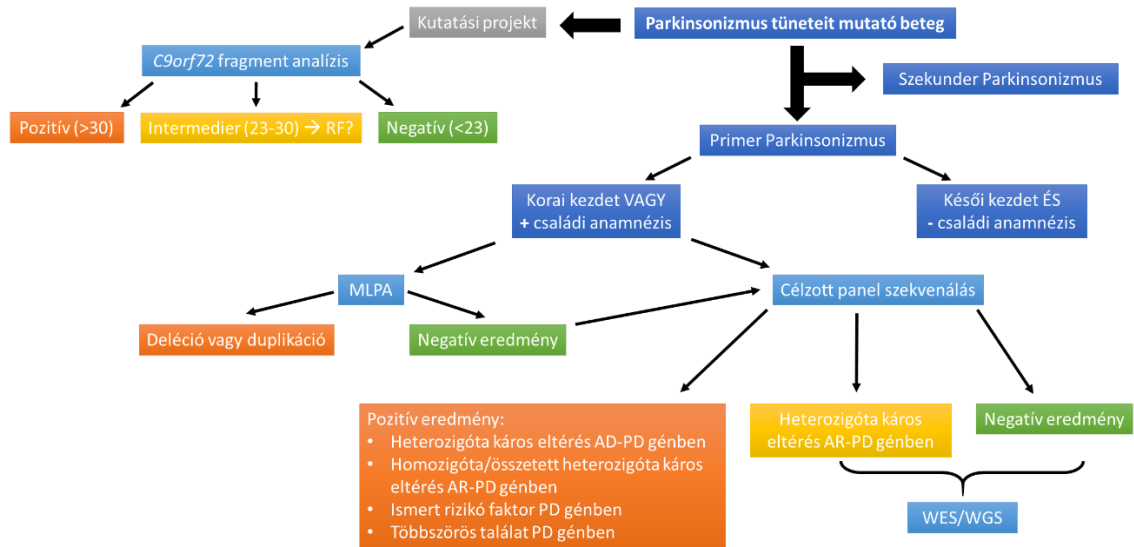
Összefoglalva: kutatásunk tovább támogatja azt a hipotézist, miszerint a mendeli PD-vel társított génekben bekövetkező változások genetikai kockázati tényezők lehetnek a sporadikus formában, és az AR-PD gének monoallélikus heterozigóta variánsa is hozzájárulhat a betegségre való hajlam növeléséhez. Az NGS technológiák széles körű elterjedésével a klinikai értékeléshez a genetikai tesztek egyre fontosabb eszközt jelentenek az EOPD klinikai vizsgálatában és kutatásában. Az NGS alkalmazása hatékonyan azonosítja az egyidejűleg fennálló patogén ritka variánsokat és a genetikai rizikó tényezőket, amelyek jelentős szerepet játszhatnak a PD komplex patogenezisének megértésében. Azonban bizonyos gének esetében a kórkép hátterében azonosított kópiaszám változással vagy repeat expanzióval járó eltérés miatt, a kialakuló fenotípus elengedhetlenné teszi az NGS elemzések kiegészítését MLPA és rt-PCR technológiákkal. A neurodegenerációval kapcsolatos gének egyidejű elemzése támogatja mind a diagnosztikai munkát, mind a klinikailag elkülönített fenokópiák értelmezését bizonyos egyedi vagy együttesen jelen lévő genetikai változatokkal, valamint a neurodegeneratív rendellenességek spektrumával kapcsolatban. A betegség bonyolultsága és az NGS technológiák jobb hozzáférhetősége miatt a genetikai tanácsadás egyre nagyobb kihívást jelent, különösen a PD-hez kapcsolódó ritka variánsok számának növekedésével. Ezért a klinikai genetikusoknak fel kell készülniük a betegséget okozó mutációkkal és kockázati faktorokkal is rendelkező betegek genetikai tanácsadására. A közeli jövőben a major betegséget okozó mutáció(k) és a kisebb kockázati tényezők együttes jelenléte már elképzelhető, hogy az egyén szintjén is értelmezhető lesz.

6 Következtetések

Vizsgálataink során a Parkinson-kór (PD) genetikai hátteréről az alábbi új információkat állapítottuk meg:

1. Magyarországon elsőként végeztünk komprehenzív genetikai vizsgálatot PD-ben. A teljes PD kohort 8,1%-ában igazoltunk monogénes okot a betegség hátterében, és a betegek 32,3%-ában genetikai hajlamosító tényezőt írtunk le. Ezen belül az AR-PD génekből hét esetben azonosítottunk feltételezhetően káros, monoallélikus eltéréseket. Ezzel további adatokkal bővítettük a heterozigóta eltérések szerepéről szóló ismereteket AR-PD génekből, amelyek valószínűleg, mint hajlamosító tényezők növelik a PD kialakulásának kockázatát.
2. A *POLG* gén elemzése során három esetben azonosítottunk potenciálisan patogén eltérést a Parkinsonizmus hátterében az általunk vizsgált magyar PD betegekben. Ez kihangsúlyozza a mitochondriális gének vizsgálatának fontosságát a Parkinsonizmussal diagnosztizált páciensek esetében.
3. Vizsgáltuk a „többszörös-találat” mechanizmus jelentőségét a Parkinsonizmus kialakulásában. A kohortban 12 esetben találtunk potenciális „többszörös-találat” hatást a betegség hátterében. Az oligogénes hatás statisztikai elemzése alapján felvázolható egy olyan tendencia, amely értelmében a potenciálisan káros, ritka variánsok dúsulása figyelhető meg az érintett személyekben. Egy olyan tendencia is körvonalazódott, amely szerint a potenciálisan káros variánsok számával fordítottan arányosan változik a tünetek megjelenésének ideje.
4. Elsőként igazoltuk magyar PD kohortban, hogy a *C9orf72* hexanukleotid repeat expanzió is társulhat Parkinsonizmussal. Ez alapján ajánlást tettünk arra, hogy a korai kezdetű PD genetikai diagnosztikájába ennek a génnek a vizsgálata is bevonandó.
5. Egy környezeti kockázati tényező (kokain) és egy genetikai hajlamosító tényező együttes hatását írtuk le egy korai Parkinsonizmus tüneteit mutató páciens esetében. Az eset alapján feltételezzük, hogy a kokain használat következtében végbemenő molekuláris változások részben visszafordíthatók. A kokainhasználat és a Parkinsonizmus kapcsolata nagyon komplex kérdéskör, amelyben az egyes asszociációk értelmezése sokat segít a Parkinsonizmus patomechanizmusának jobb megértésében.

6. Az eredményeink segítségével új genetikai diagnosztikai ajánlást dolgoztunk ki a korai kezdetű PD betegek számára (13. ábra).



13. ábra Javaslat az EOPD betegek molekuláris genetikai diagnosztikájára

Rövidítésjegyzék: EOPD: korai kezdetű Parkinson-kór, C9orf72: chromosome 9 open reading frame 72, RF: rizikó faktor, MLPA: multiplex ligáció-függő próba amplifikáció, PD: Parkinson-kór, AD-PD: autoszomális dominánsan öröklődő PD, AR-PD: autoszomális recesszíven öröklődő PD, WES: teljes exom szekvenálás, WGS: teljes genom szekvenálás.

7 Összefoglalás

A Parkinson-kór (PD) esetén a genetikai heterogenitás miatt az elmúlt években az újgenerációs szekvenálást (NGS) egyre nagyobb arányban használják a klinikai genetikai kutatásokban és a diagnosztikában is. Kutatásaink során a Parkinsonizmus klinikai képével rendelkező magyar betegek genetikai hátterét kívántuk feltérképezni. A leggyakoribbnak tartott PD-gének Sanger szekvenálását és MLPA analízisét követően célzott panel és teljes exom NGS vizsgálatot végeztünk. Az NGS eredmények klinikai értelmezhetőségének lehetőségeit vizsgáltuk. Célunk volt az általunk tervezett neurodegenerációs panel és a teljes exom szekvenálás eredményességének elemzése Parkinsonizmussal érintett betegeknél. A Parkinsonizmusban genetikai epidemiológiai vizsgálatokat végeztünk típusos és atípusos PD-kapcsolt és újonnan felmerült hajlamosító gének esetében. A vizsgált betegcsoportban elemeztük a genotípus-fenotípus összefüggéseket. Egy Parkinsonizmus fenotípussal jelentkező beteg esetében vizsgáltuk a kokain és egy genetikai hajlamosító tényező hatását. Mivel Magyarországon még nem elemezték korábban a *C9orf72* és a *POLG* gének szerepét a Parkinsonizmus epidemiológiájában célul tűztük ki ezek vizsgálatát és beillesztését a klinikai diagnosztikai gyakorlatba. Célunk volt egy genetikai diagnosztikai útvonal ajánlása a Parkinsonizmus genetikai tesztelésére. Megállapítottuk, hogy mind az általunk tervezett NGS alapú neurodegenerációs panel, mind a teljes exom szekvenálás hatékonyan alkalmazható módszer a Parkinsonizmus-formák molekuláris diagnosztikája során. A teljes PD kohort 8,1%-ában igazoltunk monogénes okot a betegség hátterében, és a betegek 32,3%-ában genetikai hajlamosító tényezőt írtunk le, amely magyarázhatja a betegek tüneteit. Magyarországon elsőként végeztünk Parkinsonizmusban átfogó genetikai elemzéseket. Az irodalomban elérhető információkat, a genotípus-fenotípus összefüggésekről, a korábban leírt AR- és AD-PD-asszociált gének és a *POLG* gén egyes eltérései esetében kibővítettük. Célzott panel és teljes exom szekvenálás révén több Parkinsonizmus genokópiát írtunk le a vizsgált kohortban. A PD betegekben heterozigóta, ritka variánsokat azonosítottunk a *POLG* génben, valamint repeat expenziót a *C9orf72* génben. A kapott eredményeink alapján egy új diagnosztikai megközelítést vezetünk be a Parkinsonizmus genetikai vizsgálatára az intézetünkben, és felvázoltuk a genetikai tanácsadás legfontosabb kérdéseit az NGS adatok értelmezésekor a PD betegek esetében.

8 Summary

In Parkinson's disease (PD) due to genetic heterogeneity, next generation sequencing (NGS) has been increasingly used in the research and diagnostics of clinical genetics. In our study, we would like to map the genetic background of Hungarian patients with Parkinsonism. After Sanger sequencing and MLPA analysis of the most common PD genes, targeted panel and whole exome NGS were performed. The clinical interpretations of NGS results were investigated. Our aim was to examine the efficacy of our neurodegeneration panel and whole exome sequencing in Parkinson's disease. In Parkinsonism, genetic epidemiological studies have been carried out on typical and atypical PD-linked and newly emerging susceptibility genes. Genotype-phenotype correlations were analyzed in the examined cohort of patients. In a patient with Parkinsonism, we investigated the effects of cocaine abuse and a genetic risk factor. As the role of the *C9orf72* and *POLG* genes in the epidemiology of Parkinsonism has not been analyzed yet in Hungary, we aimed to examine and integrate them into the practice of clinical diagnostics. Our goal was to recommend a genetic diagnostics way for genetic testing of Parkinsonism. We identified that both our NGS-based neurodegeneration panel and whole exome sequencing are effective methods for molecular diagnostics of Parkinsonism. In 8.1% of our entire PD cohort, we confirmed a monogenic cause in the background of the disease, and we described a genetic predisposing factor in 32.3% of the patients that may explain their symptoms. We were the first in Hungary who conducted comprehensive genetic analyzes of Parkinsonism. Information about genotype-phenotype correlations for the previously described AR and AD-PD associated genes and some alterations in the *POLG* gene were expanded. Through targeted panel and whole exome sequencing, several genocopies of Parkinsonism have been described in our cohort. In PD patients, heterozygous rare variants were identified in the *POLG* gene and repeat expansion in the *C9orf72* gene. Based on our findings, we introduced a new diagnostic approach to the genetic testing of Parkinsonism in our institute and outlined the key issues of genetic counseling when interpreting NGS data of PD patients.

9 Irodalomjegyzék

- (1) Tysnes O-B, Storstein A. (2017) Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 124: 901–905.
- (2) Karimi-Moghadam A, Charsouei S, Bell B, Jabalameli MR. (2018) Parkinson Disease from Mendelian Forms to Genetic Susceptibility: New Molecular Insights into the Neurodegeneration Process. *Cell Mol Neurobiol*, 38: 1153–1178.
- (3) Kempster PA, Hurwitz B, Lees AJ. (2007) A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology*, 69: 482–485.
- (4) Gardner-Thorpe C. (2010) James Parkinson (1755-1824). *J Neurol*, 257: 492–493.
- (5) Błaszczyk JW. (2016) Parkinson's disease and neurodegeneration: GABA-collapse hypothesis. *Front Neurosci*, 10:.
- (6) Magrinelli F, Picelli A, Tocco P, Federico A, Roncari L, Smania N, Zanette G, Tamburin S. (2016) Pathophysiology of Motor Dysfunction in Parkinson's Disease as the Rationale for Drug Treatment and Rehabilitation. *Parkinsons Dis*, 2016:.
- (7) Jankovic J. (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79: 368–376.
- (8) Hodge GK, Butcher LL. (1980) Pars compacta of the substantia nigra modulates motor activity but is not involved importantly in regulating food and water intake. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 313: 51–67.
- (9) Kaur R, Mehan S, Singh S. (2018) Understanding multifactorial architecture of Parkinson's disease: pathophysiology to management. *Neurol Sci*, 1–11.
- (10) Schulz-Schaeffer WJ. (2010) The synaptic pathology of α -synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol*, 120: 131–143.
- (11) I M, N P, F H. (2014) Az α -szinuklein szerepe Parkinson-kórban. 77–84.
- (12) Philippart F, Destreel G, Merino-Sepulveda P, Henny P, Engel D, Seutin V. (2016) Differential Somatic Ca²⁺ Channel Profile in Midbrain Dopaminergic Neurons. *J Neurosci*, 36: 7234–7245.
- (13) Words K. (1998) Oe men*. 65212: 401–414.
- (14) Vivekanantham S, Shah S, Dewji R, Dewji A, Khatri C, Ologunde R. (2015) Neuroinflammation in Parkinson's disease: role in neurodegeneration and tissue repair. *Int J Neurosci*, 125: 717–725.

- (15) Manev H, Favaron M, Guidotti A, Costa E. (1989) Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharmacol*, 36: 106–112.
- (16) Jaiswal MK, Zech W-D, Goos M, Leutbecher C, Ferri A, Zippelius A, Carri MT, Nau R, Keller BU. (2009) Impairment of mitochondrial calcium handling in a mtSOD1 cell culture model of motoneuron disease. *BMC Neurosci*, 10: 64.
- (17) Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. (2004) Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 45: 583–595.
- (18) Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I. (2009) Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*, 8: 1150–1157.
- (19) Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. (1999) Diagnostic Criteria for Parkinson Disease. *Arch Neurol*, 56: 33.
- (20) Adler CH, Beach TG, Hentz JG, Shill HA, Caviness JN, Driver-Dunckley E, Sabbagh MN, Sue LI, Jacobson SA, Belden CM, Dugger BN. (2014) Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: Clinicopathologic study. *Neurology*, 83: 406–412.
- (21) Schneider SA, Alcalay RN. (2017) Neuropathology of genetic synucleinopathies with parkinsonism: Review of the literature. *Mov Disord*, 32: 1504–1523.
- (22) Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G. (2015) MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 30: 1591–1601.
- (23) Postuma RB, Poewe W, Litvan I, Lewis S, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Chan P, Slow E, Seppi K, Schaffer E, Rios-Romenets S, Mi T, Maetzler C, Li Y, Heim B, Bledsoe IO, Berg D. (2018) Validation of the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*, 33: 1601–1608.
- (24) Rajput AH, Voll A, Rajput ML, Robinson CA, Rajput A. (2009) Course in Parkinson disease subtypes: A 39-year clinicopathologic study. *Neurology*, 73: 206–212.
- (25) Blochberger A, Jones S. (2011) Parkinson's disease clinical features and diagnosis. *Clin Pharm*, 3: 361–366.

- (26) Williams-Gray CH, Foltynie T, Lewis SJG, Barker RA. (2006) Cognitive Deficits and Psychosis in Parkinson's Disease: a review of pathophysiology and therapeutic options. *CNS Drugs*, 20: 477–505.
- (27) O'Sullivan SS, Williams DR, Gallagher DA, Massey LA, Silveira-Moriyama L, Lees AJ. (2008) Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: A clinicopathological study. *Mov Disord*, 23: 101–106.
- (28) Berg D, Marek K, Ross GW, Poewe W. (2012) Defining at-risk populations for Parkinson's disease: Lessons from ongoing studies. *Mov Disord*, 27: 656–665.
- (29) Stern MB, Lang A, Poewe W. (2012) Toward a redefinition of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 27: 54–60.
- (30) Lees AJ. (1991) Ageing and Parkinson ' S Disease : Substantia. 2283–2301.
- (31) Ba F, Martin WRW. (2015) Dopamine transporter imaging as a diagnostic tool for parkinsonism and related disorders in clinical practice. *Parkinsonism Relat Disord*, 21: 87–94.
- (32) Ibrahim N, Kusmirek J, Struck AF, Floberg JM, Perlman SB, Gallagher C, Hall LT. (2016) The sensitivity and specificity of F-DOPA PET in a movement disorder clinic. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 6: 102–109.
- (33) Thenganatt MA, Jankovic J. (2014) Parkinson disease subtypes. *JAMA Neurol*, 71: 499–504.
- (34) Klein C, Schlossmacher MG. (2006) The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol*, 2: 136–146.
- (35) Hedrich K, Marder K, Harris J, Kann M, Lynch T, Meija-Santana H, Pramstaller PP, Schwinger E, Bressman SB, Fahn S, Klein C. (2002) Evaluation of 50 probands with early-onset Parkinson's disease for Parkin mutations. *Neurology*, 58: 1239–1246.
- (36) Doherty KM, Silveira-Moriyama L, Parkkinen L, Healy DG, Farrell M, Mencacci NE, Ahmed Z, Brett FM, Hardy J, Quinn N, Counihan TJ, Lynch T, Fox Z V, Revesz T, Lees AJ, Holton JL. (2013) Parkin disease: a clinicopathologic entity? *JAMA Neurol*, 70: 571–579.
- (37) Wickremaratchi MM, Knipe MDW, Sastry BSD, Morgan E, Jones A, Salmon R, Weiser R, Moran M, Davies D, Ebenezer L, Raha S, Robertson NP, Butler CC, Ben-Shlomo Y, Morris HR. (2011) The motor phenotype of Parkinson's disease

- in relation to age at onset. *Mov Disord*, 26: 457–463.
- (38) Hardy J, Lewis P, Revesz T, Lees A, Paisan-Ruiz C. (2009) The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Curr Opin Genet Dev*, 19: 254–265.
- (39) Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Fidani L. (2016) The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects. *Acta Neurol Scand*, 134: 314–326.
- (40) Kim C, Alcalay R. (2017) Genetic Forms of Parkinson's Disease. *Semin Neurol*, 37: 135–146.
- (41) Davie CA. (2008) A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull*, 86: 109–127.
- (42) de Lau LM, Breteler MM. (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*, 5: 525–535.
- (43) Lesage S, Brice A. (2009) Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet*, 18: R48–R59.
- (44) Taccioli C, Tegnér J, Maselli V, Gomez-Cabrero D, Altobelli G, Emmett W, Lescai F, Gustincich S, Stupka E. (2011) ParkDB: a Parkinson's disease gene expression database. *Database (Oxford)*, 2011: bar007.
- (45) Verstraeten A, Theuns J, Van Broeckhoven C. (2015) Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era. *Trends Genet*, 31: 140–149.
- (46) Zabetian CP, Yamamoto M, Lopez AN, Ujike H, Mata IF, Izumi Y, Kaji R, Maruyama H, Morino H, Oda M, Hutter CM. (2009) LRRK2 Mutations and Risk Variants in Japanese Patients with Parkinson's Disease. *Mov Disord*, 24: 1034–1041.
- (47) Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin M-C, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert J-C, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan E-K, Van Broeckhoven C, Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium. (2006) Collaborative Analysis of α -Synuclein Gene Promoter Variability and Parkinson Disease. *JAMA*, 296: 661.
- (48) Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T,

- Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A, Tomiyama H, Nakashima K, Hasegawa K, Obata F, Yoshikawa T, Kawakami H, Sakoda S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Nakamura Y, Toda T. (2009) Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet*, 41: 1303–1307.
- (49) Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, Krüger R, Federoff M, Klein C, Goate A, Perlmutter J, Bonin M, Nalls MA, Illig T, Gieger C, Houlden H, Steffens M, Okun MS, Racette BA, Cookson MR, Foote KD, Fernandez HH, Traynor BJ, Schreiber S, Arepalli S, Zonozi R, Gwinn K, van der Brug M, Lopez G, Chanock SJ, Schatzkin A, Park Y, Hollenbeck A, Gao J, Huang X, Wood NW, Lorenz D, Deuschl G, Chen H, Riess O, Hardy JA, Singleton AB, Gasser T. (2009) Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet*, 41: 1308–1312.
- (50) Simón-Sánchez J, van Hilten JJ, van de Warrenburg B, Post B, Berendse HW, Arepalli S, Hernandez DG, de Bie RMA, Velseboer D, Scheffer H, Bloem B, van Dijk KD, Rivadeneira F, Hofman A, Uitterlinden AG, Rizzu P, Bochdanovits Z, Singleton AB, Heutink P. (2011) Genome-wide association study confirms extant PD risk loci among the Dutch. *Eur J Hum Genet*, 19: 655–661.
- (51) Lill CM, Roehr JT, McQueen MB, Kavvoura FK, Bagade S, Schjeide B-MM, Schjeide LM, Meissner E, Zauft U, Allen NC, Liu T, Schilling M, Anderson KJ, Beecham G, Berg D, Biernacka JM, Brice A, DeStefano AL, Do CB, Eriksson N, Factor SA, Farrer MJ, Foroud T, Gasser T, Hamza T, Hardy JA, Heutink P, Hill-Burns EM, Klein C, Latourelle JC, Maraganore DM, Martin ER, Martinez M, Myers RH, Nalls MA, Pankratz N, Payami H, Satake W, Scott WK, Sharma M, Singleton AB, Stefansson K, Toda T, Tung JY, Vance J, Wood NW, Zabetian CP; 23andMe Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease Consortium; International Parkinson's Disease Genomics Consortium; Parkinson's Disease GWAS Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2), Young P, Tanzi RE, Khoury MJ, Zipp F, Lehrach H, Ioannidis JP, Bertram L. (2012) Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genet*, 8: e1002548.

- (52) International Parkinson Disease Genomics Consortium IPDG, Nalls MA, Plagnol V, Hernandez DG, Sharma M, Sheerin U-M, Saad M, Simón-Sánchez J, Schulte C, Lesage S, Sveinbjörnsdóttir S, Stefánsson K, Martinez M, Hardy J, Heutink P, Brice A, Gasser T, Singleton AB, Wood NW. (2011) Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet (London, England)*, 377: 641–649.
- (53) Shulskaya M V, Alieva AK, Vlasov IN, Zyrin V V, Fedotova EY, Abramychева NY, Usenko TS, Yakimovsky AF, Emelyanov AK, Pchelina SN, Illarioshkin SN, Slominsky PA, Shadrina MI. (2018) Whole-Exome Sequencing in Searching for New Variants Associated With the Development of Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*, 10: 136.
- (54) Ryan BJ, Hoek S, Fon EA, Wade-Martins R. (2015) Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: From familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci*, 40: 200–210.
- (55) Mullin S, Schapira A. (2013) α -Synuclein and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mol Neurobiol*, 47: 587–597.
- (56) Lunati A, Lesage S, Brice A. (2018) The genetic landscape of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)*, 174: 628–643.
- (57) Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. (1997) Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science (80-)*, 276: 2045–2047.
- (58) Elahi FM, Miller BL. (2017) A clinicopathological approach to the diagnosis of dementia. *Nat Rev Neurol*, 13: 457–476.
- (59) Nguyen M, Wong YC, Ysselstein D, Severino A, Krainc D. (2019) Synaptic, Mitochondrial, and Lysosomal Dysfunction in Parkinson's Disease. *Trends Neurosci*, 42: 140–149.
- (60) Kalia L V, Lang AE. (2015) Parkinson's disease. *Lancet*, 386: 896–912.
- (61) Ruiz-Martinez J, Krebs CE, Makarov V, Gorostidi A, Martí-Massó JF, Paisán-Ruiz C. (2015) GIGYF2 mutation in late-onset Parkinson's disease with cognitive impairment. *J Hum Genet*, 60: 637–640.

- (62) Zhang Y, Sun Q, Yu R, Guo J, Tang B, Yan X. (2015) The contribution of GIGYF2 to Parkinson's disease: a meta-analysis. *Neurol Sci*, 36: 2073–2079.
- (63) Lee Y-TC, Hsu S-TD. (2017) Familial Mutations and Post-translational Modifications of UCH-L1 in Parkinson's Disease and Neurodegenerative Disorders. *Curr Protein Pept Sci*, 18: 733–745.
- (64) Puschmann A. (2017) New Genes Causing Hereditary Parkinson's Disease or Parkinsonism. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17: 66.
- (65) Youn J, Lee C, Oh E, Park J, Kim JS, Kim H-T, Cho JW, Park W-Y, Jang W, Ki C-S. (2019) Genetic variants of PARK genes in Korean patients with early-onset Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 75: 224.e9-224.e15.
- (66) Araki E, Tsuboi Y, Daechsel J, Milnerwood A, Vilarino-Guell C, Fujii N, Mishima T, Oka T, Hara H, Fukae J, Farrer MJ. (2014) A Novel *DCTN1* mutation with late-onset parkinsonism and frontotemporal atrophy. *Mov Disord*, 29: 1201–1204.
- (67) Cardona F, Perez-Tur J. (2017) Other Proteins Involved in Parkinson's Disease and Related Disorders. *Curr Protein Pept Sci*, 18: 765–778.
- (68) Lunati A, Lesage S, Brice A. (2018) The genetic landscape of Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)*, 174: 628–643.
- (69) Nuytemans K, Maldonado L, Ali A, John-Williams K, Beecham GW, Martin E, Scott WK, Vance JM. (2016) Overlap between Parkinson disease and Alzheimer disease in *ABCA7* functional variants. *Neurol Genet*, 2: e44.
- (70) Puschmann A. (2017) New Genes Causing Hereditary Parkinson's Disease or Parkinsonism. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17: 66.
- (71) Lill CM. (2016) Genetics of Parkinson's disease. *Mol Cell Probes*, 30: 386–396.
- (72) Spatola M, Wider C. (2014) Genetics of Parkinson's disease: The yield. *Park Relat Disord*, 20: S35–S38.
- (73) Kasten M, Hartmann C, Hampf J, Schaake S, Westenberger A, Vollstedt E-J, Balck A, Domingo A, Vulinovic F, Dulovic M, Zorn I, Madoev H, Zehnle H, Lembeck CM, Schawe L, Reginold J, Huang J, König IR, Bertram L, Marras C, Lohmann K, Lill CM, Klein C. (2018) Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes *Parkin*, *PINK1*, *DJI*: MDSGene Systematic Review. *Mov Disord*, 33: 730–741.
- (74) Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G,

- Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC. (1996) Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*, 274: 1197–1199.
- (75) Liu S, Ninan I, Antonova I, Battaglia F, Trinchese F, Narasanna A, Kolodilov N, Dauer W, Hawkins RD, Arancio O. (2004) alpha-Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *EMBO J*, 23: 4506–4516.
- (76) Lotharius J, Brundin P. (2002) Impaired dopamine storage resulting from alpha-synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 11: 2395–2407.
- (77) Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH. (2010) Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*, 65: 66–79.
- (78) Yu S, Zuo X, Li Y, Zhang C, Zhou M, Zhang YA, Uéda K, Chan P. (2004) Inhibition of tyrosine hydroxylase expression in α -synuclein-transfected dopaminergic neuronal cells. *Neurosci Lett*, 367: 34–39.
- (79) Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, Tzitzilonis C, Soragni A, Jessberger S, Mira H, Consiglio A, Pham E, Masliah E, Gage FH, Riek R. (2011) In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 4194–4199.
- (80) Stefanis L. (2012) α -Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a009399.
- (81) Kojovic M, Sheerin U-M, Rubio-Agusti I, Saha A, Bras J, Gibbons V, Palmer R, Houlden H, Hardy J, Wood NW, Bhatia KP. (2012) Young-onset parkinsonism due to homozygous duplication of α -synuclein in a consanguineous family. *Mov Disord*, 27: 1829–1830.
- (82) Mutez E, Leprêtre F, Le Rhun E, Larvor L, Dufлот A, Mouroux V, Kerckaert J-P, Figeac M, Dujardin K, Destée A, Chartier-Harlin M-C. (2011) SNCA locus duplication carriers: from genetics to Parkinson disease phenotypes. *Hum Mutat*, 32: E2079–E2090.
- (83) Paisán-Ruíz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simón J, Van Der Brug M, De Munain AL, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D,

- Carrera IM, Peña AS, De Silva R, Lees A, Martí-Massó JF, Pérez-Tur J, Wood NW, Singleton AB. (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron*, 44: 595–600.
- (84) Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK, Berciano J, Schapira AH, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ, Wood NW. (2008) Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*, 7: 583–590.
- (85) Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, Ohmann E, Deligtisch A, Tagliati M, Hunt AL, Klein C, Henick B, Hailpern SM, Lipton RB, Soto-Valencia J, Risch N, Bressman SB. (2006) *LRRK2* G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*, 354: 424–425.
- (86) Trinh J, Guella I, Farrer MJ. (2014) Disease Penetrance of Late-Onset Parkinsonism. *JAMA Neurol*, 71: 1535.
- (87) Wu Y-R, Chang K-H, Chang W-T, Hsiao Y-C, Hsu H-C, Jiang P-R, Chen Y-C, Chao C-Y, Chang Y-C, Lee B-H, Hu F-J, Chen W-L, Lee-Chen G-J, Chen C-M. (2013) Genetic variants of *LRRK2* in Taiwanese Parkinson's disease. *PLoS One*, 8: e82001.
- (88) Mata IF, Kachergus JM, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Lynch T, Hulihan MM, Cobb SA, Wu RM, Lu CS, Lahoz C, Wszolek ZK, Farrer MJ. (2005) *Lrrk2* pathogenic substitutions in Parkinson's disease. *Neurogenetics*, 6: 171–177.
- (89) Nuytemans K, Meeus B, Crosiers D, Brouwers N, Goossens D, Engelborghs S, Pals P, Pickut B, Van Den Broeck M, Corsmit E, Cras P, De Deyn PP, Del-Favero J, Van Broeckhoven C, Theuns J. (2009) Relative contribution of simple mutations vs. copy number variations in five Parkinson disease genes in the Belgian population. *Hum Mutat*, 30: 1054–1061.
- (90) Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK, Berciano J, Schapira AH V, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ, Wood NW, International LRRK2 Consortium on behalf of the IL. (2008) Phenotype, genotype, and worldwide

- genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurol*, 7: 583–590.
- (91) Lesage S, Condroyer C, Lannuzel A, Lohmann E, Troiano A, Tison F, Damier P, Thobois S, Ouvrard-Hernandez AM, Rivaud-Péchoux S, Brefel-Courbon C, Destée A, Tranchant C, Romana M, Leclere L, Dürr A, Brice A. (2009) Molecular analyses of the LRRK2 gene in European and North African autosomal dominant Parkinson's disease. *J Med Genet*, 46: 458–464.
- (92) Lesage S, Dürr A, Tazir M, Lohmann E, Leutenegger A-L, Janin S, Pollak P, Brice A. (2006) *LRRK2* G2019S as a Cause of Parkinson's Disease in North African Arabs. *N Engl J Med*, 354: 422–423.
- (93) Kluss JH, Mamais A, Cookson MR. (2019) LRRK2 links genetic and sporadic Parkinson's disease. *Biochem Soc Trans*, 47: 651–661.
- (94) Wang X, Yan MH, Fujioka H, Liu J, Wilson-Delfosse A, Chen SG, Perry G, Casadesus G, Zhu X. (2012) LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1. *Hum Mol Genet*, 21: 1931–1944.
- (95) Vilariño-Güell C, Wider C, Ross OA, Dachselt JC, Kachergus JM, Lincoln SJ, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Wilhoite GJ, Bacon JA, Behrouz B, Melrose HL, Hentati E, Puschmann A, Evans DM, Conibear E, Wasserman WW, Aasly JO, Burkhardt PR, Djaldetti R, Ghika J, Hentati F, Krygowska-Wajs A, Lynch T, Melamed E, Rajput A, Rajput AH, Solida A, Wu R-M, Uitti RJ, Wszolek ZK, Vingerhoets F, Farrer MJ. (2011) VPS35 mutations in Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 89: 162–167.
- (96) Fuse A, Furuya N, Kakuta S, Inose A, Sato M, Koike M, Saiki S, Hattori N. (2015) VPS29-VPS35 intermediate of retromer is stable and may be involved in the retromer complex assembly process. *FEBS Lett*, 589: 1430–1436.
- (97) Tsika E, Glauser L, Moser R, Fiser A, Daniel G, Sheerin U-M, Lees A, Troncoso JC, Lewis PA, Bandopadhyay R, Schneider BL, Moore DJ. (2014) Parkinson's disease-linked mutations in VPS35 induce dopaminergic neurodegeneration. *Hum Mol Genet*, 23: 4621–4638.
- (98) Zavodszky E, Seaman MNJ, Moreau K, Jimenez-Sanchez M, Breusegem SY, Harbour ME, Rubinsztein DC. (2014) Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy.

- Nat Commun, 5: 3828.
- (99) Follett J, Norwood SJ, Hamilton NA, Mohan M, Kovtun O, Tay S, Zhe Y, Wood SA, Mellick GD, Silburn PA, Collins BM, Bugarcic A, Teasdale RD. (2014) The Vps35 D620N Mutation Linked to Parkinson's Disease Disrupts the Cargo Sorting Function of Retromer. *Traffic*, 15: 230–244.
- (100) Hernandez DG, Reed X, Singleton AB. (2016) Genetics in Parkinson disease: Mendelian versus non-Mendelian inheritance. *J Neurochem*, 139 Suppl 1: 59–74.
- (101) Miura E, Hasegawa T, Konno M, Suzuki M, Sugeno N, Fujikake N, Geisler S, Tabuchi M, Oshima R, Kikuchi A, Baba T, Wada K, Nagai Y, Takeda A, Aoki M. (2014) VPS35 dysfunction impairs lysosomal degradation of α -synuclein and exacerbates neurotoxicity in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 71: 1–13.
- (102) Clot F, Grabli D, Cazeneuve C, Roze E, Castelnau P, Chabrol B, Landrieu P, Nguyen K, Ponsot G, Abada M, Doummar D, Damier P, Gil R, Thobois S, Ward AJ, Hutchinson M, Toutain A, Picard F, Camuzat A, Fedirko E, San C, Bouteiller D, LeGuern E, Durr A, Vidailhet M, Brice A. (2009) Exhaustive analysis of BH4 and dopamine biosynthesis genes in patients with Dopa-responsive dystonia. *Brain*, 132: 1753–1763.
- (103) Guella I, Sherman HE, Appel-Cresswell S, Rajput A, Rajput AH, Farrer MJ. (2015) Parkinsonism in GTP cyclohydrolase 1 mutation carriers. *Brain*, 138: e349.
- (104) Mencacci NE, Isaias IU, Reich MM, Ganos C, Plagnol V, Polke JM, Bras J, Hershenson J, Stamelou M, Pittman AM, Noyce AJ, Mok KY, Opladen T, Kunstmann E, Hodecker S, Münchau A, Volkmann J, Samnick S, Sidle K, Nanji T, Sweeney MG, Houlden H, Batla A, Zecchinelli AL, Pezzoli G, Marotta G, Lees A, Alegria P, Krack P, Cormier-Dequaire F, Lesage S, Brice A, Heutink P, Gasser T, Lubbe SJ, Morris HR, Taba P, Koks S, Majounie E, Raphael Gibbs J, Singleton A, Hardy J, Klebe S, Bhatia KP, Wood NW, International Parkinson's Disease Genomics Consortium and UCL-exomes consortium. (2014) Parkinson's disease in GTP cyclohydrolase 1 mutation carriers. *Brain*, 137: 2480–2492.
- (105) Gwinn-Hardy K, Chen JY, Liu HC, Liu TY, Boss M, Seltzer W, Adam A, Singleton A, Koroshetz W, Waters C, Hardy J, Farrer M. (2000) Spinocerebellar ataxia type 2 with parkinsonism in ethnic Chinese. *Neurology*, 55: 800–805.

- (106) Payami H, Nutt J, Gancher S, Bird T, McNeal MG, Seltzer WK, Hussey J, Lockhart P, Gwinn-Hardy K, Singleton AA, Singleton AB, Hardy J, Farrer M. (2003) SCA2 may present as levodopa-responsive parkinsonism. *Mov Disord*, 18: 425–429.
- (107) Lu C-S, Wu Chou Y-H, Kuo P-C, Chang H-C, Weng Y-H. (2004) The Parkinsonian Phenotype of Spinocerebellar Ataxia Type 2. *Arch Neurol*, 61: 35.
- (108) Ragothaman M, Sarangmath N, Chaudhary S, Khare V, Mittal U, Sharma S, Komatireddy S, Chakrabarti S, Mukerji M, Juyal RC, Thelma BK, Muthane UB. (2004) Complex phenotypes in an Indian family with homozygous SCA2 mutations. *Ann Neurol*, 55: 130–133.
- (109) Al-Ramahi I, Pérez AM, Lim J, Zhang M, Sorensen R, de Haro M, Branco J, Pulst SM, Zoghbi HY, Botas J. (2007) dAtaxin-2 Mediates Expanded Ataxin-1-Induced Neurodegeneration in a Drosophila Model of SCA1. *PLoS Genet*, 3: e234.
- (110) Halbach MV, Stehning T, Damrath E, Jendrach M, Şen NE, Başak AN, Auburger G. (2015) Both Ubiquitin Ligases FBXW8 and PARK2 Are Sequestered into Insolubility by ATXN2 PolyQ Expansions, but Only FBXW8 Expression Is Dysregulated. *PLoS One*, 10: e0121089.
- (111) Satterfield TF, Pallanck LJ. (2006) Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. *Hum Mol Genet*, 15: 2523–2532.
- (112) Nkiliza A, Mutez E, Simonin C, Leprêtre F, Duflot A, Figeac M, Villenet C, Semaille P, Comptdaer T, Genet A, Sablonnière B, Devos D, Defebvre L, Destée A, Chartier-Harlin M-C. (2016) RNA-binding disturbances as a continuum from spinocerebellar ataxia type 2 to Parkinson disease. *Neurobiol Dis*, 96: 312–322.
- (113) Yoshida S, Hasegawa T, Suzuki M, Sugeno N, Kobayashi J, Ueyama M, Fukuda M, Ido-Fujibayashi A, Sekiguchi K, Ezura M, Kikuchi A, Baba T, Takeda A, Mochizuki H, Nagai Y, Aoki M. (2018) Parkinson’s disease-linked DNAJC13 mutation aggravates alpha-synuclein-induced neurotoxicity through perturbation of endosomal trafficking. *Hum Mol Genet*, 27: 823–836.
- (114) Chartier-Harlin M-C, Dachsel JC, Vilariño-Güell C, Lincoln SJ, Leprêtre F, Hulihan MM, Kachergus J, Milnerwood AJ, Tapia L, Song M-S, Le Rhun E, Mutez E, Larvor L, Duflot A, Vanbesien-Mailliot C, Kreisler A, Ross OA, Nishioka K, Soto-Ortolaza AI, Cobb SA, Melrose HL, Behrouz B, Keeling BH, Bacon JA,

- Hentati E, Williams L, Yanagiya A, Sonenberg N, Lockhart PJ, Zubair AC, Uitti RJ, Aasly JO, Krygowska-Wajs A, Opala G, Wszolek ZK, Frigerio R, Maraganore DM, Gosal D, Lynch T, Hutchinson M, Bentivoglio AR, Valente EM, Nichols WC, Pankratz N, Foroud T, Gibson RA, Hentati F, Dickson DW, Destée A, Farrer MJ. (2011) Translation initiator EIF4G1 mutations in familial Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 89: 398–406.
- (115) Ali IK, McKendrick L, Morley SJ, Jackson RJ. (2001) Truncated initiation factor eIF4G lacking an eIF4E binding site can support capped mRNA translation. *EMBO J*, 20: 4233–4242.
- (116) Ramírez-Valle F, Braunstein S, Zavadil J, Formenti SC, Schneider RJ. (2008) eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy. *J Cell Biol*, 181: 293–307.
- (117) Silvera D, Arju R, Darvishian F, Levine PH, Zolfaghari L, Goldberg J, Hochman T, Formenti SC, Schneider RJ. (2009) Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. *Nat Cell Biol*, 11: 903–908.
- (118) Sudhaman S, Muthane UB, Behari M, Govindappa ST, Juyal RC, Thelma BK. (2016) Evidence of mutations in *RIC3* acetylcholine receptor chaperone as a novel cause of autosomal-dominant Parkinson’s disease with non-motor phenotypes. *J Med Genet*, 53: 559–566.
- (119) Deng H-X, Shi Y, Yang Y, Ahmeti KB, Miller N, Huang C, Cheng L, Zhai H, Deng S, Nuytemans K, Corbett NJ, Kim MJ, Deng H, Tang B, Yang Z, Xu Y, Chan P, Huang B, Gao X-P, Song Z, Liu Z, Fecto F, Siddique N, Foroud T, Jankovic J, Ghetti B, Nicholson DA, Krainc D, Melen O, Vance JM, Pericak-Vance MA, Ma Y-C, Rajput AH, Siddique T. (2016) Identification of TMEM230 mutations in familial Parkinson’s disease. *Nat Genet*, 48: 733–739.
- (120) Ma D, Foo JN, Yulin Ng E, Zhao Y, Liu J-J, Tan EK. (2017) Screening for TMEM230 mutations in young-onset Parkinson’s disease. *Neurobiol Aging*, 197–198.
- (121) Giri A, Mok KY, Jansen I, Sharma M, Tesson C, Mangone G, Lesage S, Bras JM, Shulman JM, Sheerin UM, Díez-Fairen M, Pastor P, Martí MJ, Ezquerra M, Tolosa E, Correia-Guedes L, Ferreira J, Amin N, van Duijn CM, van Rooij J, Uitterlinden AG, Kraaij R, Nalls M, Simón-Sánchez J. (2017) Lack of evidence for a role of

- genetic variation in TMEM230 in the risk for Parkinson's disease in the Caucasian population. *Neurobiol Aging*, 50: 167.e11-167.e13.
- (122) Meray RK, Lansbury PT. (2007) Reversible Monoubiquitination Regulates the Parkinson Disease-associated Ubiquitin Hydrolase UCH-L1. *J Biol Chem*, 282: 10567–10575.
- (123) Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. (1998) The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature*, 395: 451–452.
- (124) Healy DG, Abou-Sleiman PM, Wood NW. (2004) Genetic causes of Parkinson's disease: UCHL-1. *Cell Tissue Res*, 318: 189–194.
- (125) Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. (2007) Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47: 89–116.
- (126) Nishikawa K, Li H, Kawamura R, Osaka H, Wang Y-L, Hara Y, Hirokawa T, Manago Y, Amano T, Noda M, Aoki S, Wada K. (2003) Alterations of structure and hydrolase activity of parkinsonism-associated human ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 variants. *Biochem Biophys Res Commun*, 304: 176–183.
- (127) Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Rudolph A, Shults C, Conneally PM, Foroud T, Parkinson Study Group the PS. (2002) Genome screen to identify susceptibility genes for Parkinson disease in a sample without parkin mutations. *Am J Hum Genet*, 71: 124–135.
- (128) Tan EK, Schapira AH. (2010) Summary of GIGYF2 studies in Parkinson's disease: the burden of proof. *Eur J Neurol*, 17: 175–176.
- (129) Lautier C, Goldwurm S, Dürr A, Giovannone B, Tsiaras WG, Pezzoli G, Brice A, Smith RJ. (2008) Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) Gene at the PARK11 Locus in Familial Parkinson Disease. *Am J Hum Genet*, 82: 822–833.
- (130) Giovannone B, Lee E, Laviola L, Giorgino F, Cleveland KA, Smith RJ. (2003) Two Novel Proteins That Are Linked to Insulin-like Growth Factor (IGF-I) Receptors by the Grb10 Adapter and Modulate IGF-I Signaling. *J Biol Chem*, 278: 31564–31573.
- (131) Giovannone B, Tsiaras WG, de la Monte S, Klysik J, Lautier C, Karashchuk G,

- Goldwurm S, Smith RJ. (2009) GIGYF2 gene disruption in mice results in neurodegeneration and altered insulin-like growth factor signaling. *Hum Mol Genet*, 18: 4629–4639.
- (132) Bras J, Simon-Sanchez J, Federoff M, Morgadinho A, Januario C, Ribeiro M, Cunha L, Oliveira C, Singleton AB. (2008) Lack of replication of association between GIGYF2 variants and Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 18: 341–346.
- (133) Di Fonzo A, Fabrizio E, Thomas A, Fincati E, Marconi R, Tinazzi M, Breedveld GJ, Simons EJ, Chien HF, Ferreira JJ, Horstink MW, Abbruzzese G, Borroni B, Cossu G, Libera AD, Fabbrini G, Guidi M, De Mari M, Lopiano L, Martignoni E, Marini P, Onofrij M, Padovani A, Stocchi F, Toni V, Sampaio C, Barbosa ER, Meco G, Oostra BA, Bonifati V, Bonifati V. (2009) GIGYF2 mutations are not a frequent cause of familial Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 15: 703–705.
- (134) Guo Y, Jankovic J, Zhu S, Le W, Song Z, Xie W, Liao D, Yang H, Deng H. (2009) GIGYF2 Asn56Ser and Asn457Thr mutations in Parkinson disease patients. *Neurosci Lett*, 454: 209–211.
- (135) Strauss KM, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Müller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Krüger R. (2005) Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 14: 2099–2111.
- (136) Lin C-H, Chen M-L, Chen GS, Tai C-H, Wu R-M. (2011) Novel variant Pro143Ala in HTRA2 contributes to Parkinson's disease by inducing hyperphosphorylation of HTRA2 protein in mitochondria. *Hum Genet*, 130: 817–827.
- (137) Wang C-Y, Xu Q, Weng L, Zhang Q, Zhang H-N, Guo J-F, Tan L-M, Tang J-G, Yan X-X, Tang B-S. (2011) Genetic variations of Omi/HTRA2 in Chinese patients with Parkinson's disease. *Brain Res*, 1385: 293–297.
- (138) Vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenabeele P. (2008) The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ*, 15: 453–460.
- (139) Cilenti L, Ambivero CT, Ward N, Alnemri ES, Germain D, Zervos AS. (2014) Inactivation of Omi/HtrA2 protease leads to the deregulation of mitochondrial Mulan E3 ubiquitin ligase and increased mitophagy. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, 1843: 1295–1307.

- (140) Kieper N, Holmström KM, Ciceri D, Fiesel FC, Wolburg H, Ziviani E, Whitworth AJ, Martins LM, Kahle PJ, Krüger R. (2010) Modulation of mitochondrial function and morphology by interaction of Omi/HtrA2 with the mitochondrial fusion factor OPA1. *Exp Cell Res*, 316: 1213–1224.
- (141) Bogaerts V, Nuytemans K, Reumers J, Pals P, Engelborghs S, Pickut B, Corsmit E, Peeters K, Schymkowitz J, De Deyn PP, Cras P, Rousseau F, Theuns J, Van Broeckhoven C. (2008) Genetic variability in the mitochondrial serine protease *HTRA2* contributes to risk for Parkinson disease. *Hum Mutat*, 29: 832–840.
- (142) Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. (2015) CHCHD2 mutations in autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol*, 14: 274–282.
- (143) Aras S, Pak O, Sommer N, Finley R, Hüttemann M, Weissmann N, Grossman LI. (2013) Oxygen-dependent expression of cytochrome c oxidase subunit 4-2 gene expression is mediated by transcription factors RBPJ, CXXC5 and CHCHD2. *Nucleic Acids Res*, 41: 2255–2266.
- (144) Yokoyama JS, Sirkis DW, Miller BL. (2014) C9ORF72 hexanucleotide repeats in behavioral and motor neuron disease: clinical heterogeneity and pathological diversity. *Am J Neurodegener Dis*, 3: 1–18.
- (145) Ugolino J, Ji YJ, Conchina K, Chu J, Nirujogi RS, Pandey A, Brady NR, Hamacher-Brady A, Wang J. (2016) Loss of C9orf72 Enhances Autophagic Activity via Deregulated mTOR and TFEB Signaling. *PLOS Genet*, 12: e1006443.
- (146) Amick J, Roczniak-Ferguson A, Ferguson SM. (2016) C9orf72 binds SMCR8, localizes to lysosomes, and regulates mTORC1 signaling. *Mol Biol Cell*, 27: 3040–3051.
- (147) Woollacott IOC, Mead S. (2014) The C9ORF72 expansion mutation: Gene structure, phenotypic and diagnostic issues. *Acta Neuropathol*, 127: 319–332.
- (148) Reddy K, Zamiri B, Stanley SYR, Macgregor RB, Pearson CE. (2013) The disease-associated r(GGGGCC)_n repeat from the C9orf72 gene forms tract length-dependent uni- and multimolecular RNA G-quadruplex structures. *J Biol Chem*,

- 288: 9860–9866.
- (149) Pamphlett R, Cheong PL, Trent RJ, Yu B. (2012) Transmission of C9orf72 hexanucleotide repeat expansions in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport*, 23: 556–559.
- (150) Beck J, Poulter M, Hensman D, Rohrer JD, Mahoney CJ, Adamson G, Campbell T, Uphill J, Borg A, Fratta P, Orrell RW, Malaspina A, Rowe J, Brown J, Hodges J, Sidle K, Polke JM, Houlden H, Schott JM, Fox NC, Rossor MN, Tabrizi SJ, Isaacs AM, Hardy J, Warren JD, Collinge J, Mead S. (2013) Large C9orf72 hexanucleotide repeat expansions are seen in multiple neurodegenerative syndromes and are more frequent than expected in the UK population. *Am J Hum Genet*, 92: 345–353.
- (151) Xi Z, Zinman L, Grinberg Y, Moreno D, Sato C, Bilbao JM, Ghani M, Hernández I, Ruiz A, Boada M, Morón FJ, Lang AE, Marras C, Bruni A, Colao R, Maletta RG, Puccio G, Rainero I, Pinessi L, Galimberti D, Morrison KE, Moorby C, Stockton JD, Masellis M, Black SE, Hazrati L-N, Liang Y, van Haersma de With J, Fornazzari L, Villagra R, Rojas-Garcia R, Clarimón J, Mayeux R, Robertson J, St George-Hyslop P, Rogaeva E. (2012) Investigation of c9orf72 in 4 neurodegenerative disorders. *Arch Neurol*, 69: 1583–1590.
- (152) Boeve BF, Boylan KB, Graff-Radford NR, DeJesus-Hernandez M, Knopman DS, Pedraza O, Vemuri P, Jones D, Lowe V, Murray ME, Dickson DW, Josephs KA, Rush BK, Machulda MM, Fields JA, Ferman TJ, Baker M, Rutherford NJ, Adamson J, Wszolek ZK, Adeli A, Savica R, Boot B, Kuntz KM, Gavrilova R, Reeves A, Whitwell J, Kantarci K, Jack CR, Parisi JE, Lucas JA, Petersen RC, Rademakers R, Rademakers R. (2012) Characterization of frontotemporal dementia and/or amyotrophic lateral sclerosis associated with the GGGGCC repeat expansion in C9ORF72. *Brain*, 135: 765–783.
- (153) Liu Y, Yu J-T, Zong Y, Zhou J, Tan L. (2014) C9ORF72 Mutations in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*, 49: 386–398.
- (154) Elfferich P, Verleun-Mooijman MC, Maat-Kievit JA, van de Warrenburg BPC, Abdo WF, Eshuis SA, Leenders KL, Hovestadt A, Zijlmans JCM, Stroy J-PM, van Swieten JC, Boon AJW, van Engelen K, Verschuuren-Bemelmans CC, Lesnik-Oberstein SAJ, Tassorelli C, Lopiano L, Bonifati V, Dooijes D, van Minkelen R.

- (2011) Breakpoint mapping of 13 large parkin deletions/duplications reveals an exon 4 deletion and an exon 7 duplication as founder mutations. *Neurogenetics*, 12: 263–271.
- (155) Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Denèfle P, Wood NW, Agid Y, Brice A, French Parkinson's Disease Genetics Study Group MMB, European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease BA, De Mari M, Marconi R, Filla A, Bonnet A-M, Broussolle E, Pollak P, Rascol O, Rosier M, Arnould A, Brice A. (2000) Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med*, 342: 1560–1567.
- (156) Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, Ricard S, Teive H, Fraix V, Vidailhet M, Nicholl D, Barone P, Wood NW, Raskin S, Deleuze JF, Agid Y, Dürr A, Brice A, Bonnet AM, Borg M, Broussolle E, Damier P, Destée A, Durif F, Feingold J, Fénelon G, Martinez M, Penet C, Pollak P, Rascol O, Tison F, Tranchant C, Verin M, Viallet F, Warter JM, Gasser T, Müller-Myhsok B, Breteler M, Harhangi S, Oostra B, Bonifati V, Vanacore N, Fabrizio E, Filla A, Meco G. (2003) Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain*, 126: 1271–1278.
- (157) Mata IF, Lockhart PJ, Farrer MJ. (2004) Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum Mol Genet*, 13: 127R – 133.
- (158) Klein C, Hedrich K, Wellenbrock C, Kann M, Harris J, Marder K, Lang AE, Schwinger E, Ozelius LJ, Vieregge P, Pramstaller PP, Kramer PL. (2003) Frequency of parkin mutations in late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 54: 415–416.
- (159) Kilarski LL, Pearson JP, Newsday V, Majounie E, Knipe MDW, Misbahuddin A, Chinnery PF, Burn DJ, Clarke CE, Marion MH, Lewthwaite AJ, Nicholl DJ, Wood NW, Morrison KE, Williams-Gray CH, Evans JR, Sawcer SJ, Barker RA, Wickremaratchi MM, Ben-Shlomo Y, Williams NM, Morris HR. (2012) Systematic Review and UK-Based Study of PARK2 (parkin), PINK1, PARK7 (DJ-1) and LRRK2 in early-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, 27: 1522–1529.
- (160) Hedrich K, Eskelson C, Wilmot B, Marder K, Harris J, Garrels J, Meija-Santana

- H, Vieregge P, Jacobs H, Bressman SB, Lang AE, Kann M, Abbruzzese G, Martinelli P, Schwinger E, Ozelius LJ, Pramstaller PP, Klein C, Kramer P. (2004) Distribution, type and origin of Parkin mutations: Review and case studies. *Mov Disord*, 19: 1146–1157.
- (161) Stenson PD, Mort M, Ball E V, Evans K, Hayden M, Heywood S, Hussain M, Phillips AD, Cooper DN. (2017) The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet*, 136: 665–677.
- (162) Wu YR, Wu CH, Chao CY, Kuan CC, Zhang WL, Wang CK, Chang CY, Chang YC, Lee-Chen GJ, Chen CM. (2010) Genetic analysis of Parkin in early onset Parkinson's disease (PD): Novel intron 9 g > a single nucleotide polymorphism and risk of Taiwanese PD. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*, 153: 229–234.
- (163) Smith DI, Zhu Y, McAvoy S, Kuhn R. (2006) Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer. *Cancer Lett*, 232: 48–57.
- (164) Hristova VA, Beasley SA, Rylett RJ, Shaw GS. (2009) Identification of a novel Zn²⁺-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *J Biol Chem*, 284: 14978–14986.
- (165) Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*, 25: 302–305.
- (166) Tanaka K, Suzuki T, Hattori N, Mizuno Y. (2004) Ubiquitin, proteasome and parkin. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*, 1695: 235–247.
- (167) Pickrell AM, Youle RJ. (2015) The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*, 85: 257–273.
- (168) Marongiu R, Ferraris A, Ialongo T, Michiorri S, Soleti F, Ferrari F, Elia AE, Ghezzi D, Albanese A, Altavista MC, Antonini A, Barone P, Brusa L, Cortelli P, Martinelli P, Pellecchia MT, Pezzoli G, Scaglione C, Stanzione P, Tinazzi M, Zecchinelli A, Zeviani M, Cassetta E, Garavaglia B, Dallapiccola B, Bentivoglio AR, Valente EM, Italian PD Study Group. (2008) PINK1 heterozygous rare variants: prevalence, significance and phenotypic spectrum. *Hum Mutat*, 29: 565.
- (169) Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S,

- Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, González-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. (2004) Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science* (80-), 304: 1158–1160.
- (170) Spatola M, Wider C. (2014) Genetics of Parkinson's disease: the yield. *Parkinsonism Relat Disord*, 20: S35–S38.
- (171) Ibáñez P, Lesage S, Lohmann E, Thobois S, De Michele G, Borg M, Agid Y, Dürr A, Brice A. (2006) Mutational analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa. *Brain*, 129: 686–694.
- (172) Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C. (2010) Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: A mutation update. *Hum Mutat*, 31: 763–780.
- (173) Truban D, Hou X, Caulfield TR, Fiesel FC, Springer W. (2017) PINK1, Parkin, and Mitochondrial Quality Control: What can we Learn about Parkinson's Disease Pathobiology? *J Parkinsons Dis*, 7: 13–29.
- (174) Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, Dawson TM. (2014) Parkin and PINK1: much more than mitophagy. *Trends Neurosci*, 37: 315–324.
- (175) Deas E, Plun-Favreau H, Wood NW. (2009) PINK1 function in health and disease. *EMBO Mol Med*, 1: 152–165.
- (176) Gautier CA, Kitada T, Shen J. (2008) Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 11364–11369.
- (177) Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MCJ, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P. (2003) Mutations in the DJ-1 Gene Associated with Autosomal Recessive Early-Onset Parkinsonism. *Science* (80-), 299: 256–259.
- (178) Ottolini D, Cali T, Negro A, Brini M. (2013) The Parkinson disease-related protein DJ-1 counteracts mitochondrial impairment induced by the tumour suppressor protein p53 by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria tethering. *Hum Mol Genet*, 22: 2152–2168.

- (179) Velayos-Baeza A, Vettori A, Copley RR, Dobson-Stone C, Monaco AP. (2004) Analysis of the human VPS13 gene family. *Genomics*, 84: 536–549.
- (180) Lesage S, Drouet V, Majounie E, Deramecourt V, Jacoupy M, Nicolas A, Cormier-Dequaire F, Hassoun SM, Pujol C, Ciura S, Erpapazoglou Z, Usenko T, Maurage CA, Sahbatou M, Liebau S, Ding J, Bilgic B, Emre M, Erginel-Unaltuna N, Guven G, Tison F, Tranchant C, Vidailhet M, Corvol JC, Krack P, Leutenegger AL, Nalls MA, Hernandez DG, Heutink P, Gibbs JR, Hardy J, Wood NW, Gasser T, Durr A, Deleuze JF, Tazir M, Destée A, Lohmann E, Kabashi E, Singleton A, Corti O, Brice A, French Parkinson's Disease Genetics Study (PDG); International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC). (2016) Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy. *Am J Hum Genet*, 98: 500–513.
- (181) Schreglmann SR, Houlden H. (2016) *VPS13C* -Another Hint at Mitochondrial Dysfunction in Familial Parkinson's Disease. *Mov Disord*, 31: 1340–1340.
- (182) Olgiati S, Quadri M, Fang M, Rood JPMA, Saute JA, Chien HF, Bouwkamp CG, Graafland J, Minneboo M, Breedveld GJ, Zhang J, Verheijen FW, Boon AJW, Kievit AJA, Jardim LB, Mandemakers W, Barbosa ER, Rieder CRM, Leenders KL, Wang J, Bonifati V, Bonifati V. (2016) *DNAJC6* Mutations Associated With Early-Onset Parkinson's Disease. *Ann Neurol*, 79: 244–256.
- (183) Kononenko NL, Haucke V. (2015) Molecular Mechanisms of Presynaptic Membrane Retrieval and Synaptic Vesicle Reformation. *Neuron*, 85: 484–496.
- (184) Cao M, Wu Y, Ashrafi G, McCartney AJ, Wheeler H, Bushong EA, Boassa D, Ellisman MH, Ryan TA, De Camilli P. (2017) Parkinson Sac Domain Mutation in Synaptojanin 1 Impairs Clathrin Uncoating at Synapses and Triggers Dystrophic Changes in Dopaminergic Axons. *Neuron*, 93: 882-896.e5.
- (185) Kurian MA, Morgan N V., MacPherson L, Foster K, Peake D, Gupta R, Philip SG, Hendriksz C, Morton JEV, Kingston HM, Rosser EM, Wassmer E, Gissen P, Maher ER. (2008) Phenotypic spectrum of neurodegeneration associated with mutations in the PLA2G6 gene (PLAN). *Neurology*, 70: 1623–1629.
- (186) Balsinde J, Balboa M. (2005) Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A in activated cells. *Cell Signal*,

- 17: 1052–1062.
- (187) Shinzawa K, Sumi H, Ikawa M, Matsuoka Y, Okabe M, Sakoda S, Tsujimoto Y. (2008) Neuroaxonal Dystrophy Caused by Group VIA Phospholipase A2 Deficiency in Mice: A Model of Human Neurodegenerative Disease. *J Neurosci*, 28: 2212–2220.
- (188) Engel LA, Jing Z, O’Brien DE, Sun M, Kotzbauer PT. (2010) Catalytic Function of PLA2G6 Is Impaired by Mutations Associated with Infantile Neuroaxonal Dystrophy but Not Dystonia-Parkinsonism. *PLoS One*, 5: e12897.
- (189) Kauther KM, Höft C, Rissling I, Oertel WH, Möller JC. (2011) The PLA2G6 gene in early-onset Parkinson’s disease. *Mov Disord*, 26: 2415–2417.
- (190) Shojaee S, Sina F, Banihosseini SS, Kazemi MH, Kalhor R, Shahidi G-A, Fakhrai-Rad H, Ronaghi M, Elahi E. (2008) Genome-wide Linkage Analysis of a Parkinsonian-Pyramidal Syndrome Pedigree by 500 K SNP Arrays. *Am J Hum Genet*, 82: 1375–1384.
- (191) Di Fonzo A, Dekker MCJ, Montagna P, Baruzzi A, Yonova EH, Guedes LC, Szczerbinska A, Zhao T, Dubbel-Hulsman LOM, Wouters CH, de Graaff E, Oyen WJG, Simons EJ, Breedveld GJ, Oostra BA, Horstink MW, Bonifati V. (2009) FBXO7 mutations cause autosomal recessive, early-onset parkinsonian-pyramidal syndrome. *Neurology*, 72: 240–245.
- (192) Paisán-Ruiz C, Guevara R, Federoff M, Hanagasi H, Sina F, Elahi E, Schneider SA, Schwingenschuh P, Bajaj N, Emre M, Singleton AB, Hardy J, Bhatia KP, Brandner S, Lees AJ, Houlden H. (2010) Early-onset L-dopa-responsive parkinsonism with pyramidal signs due to ATP13A2, PLA2G6, FBXO7 and spatacsin mutations. *Mov Disord*, 25: 1791–1800.
- (193) Yalcin-Cakmakli G, Olgiati S, Quadri M, Breedveld GJ, Cortelli P, Bonifati V, Elibol B. (2014) A new Turkish family with homozygous FBXO7 truncating mutation and juvenile atypical parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord*, 20: 1248–1252.
- (194) Lohmann E, Coquel A-S, Honoré A, Gurvit H, Hanagasi H, Emre M, Leutenegger AL, Drouet V, Sahbatou M, Guven G, Erginel-Unaltuna N, Deleuze J-F, Lesage S, Brice A. (2015) A new F-box protein 7 gene mutation causing typical Parkinson’s disease. *Mov Disord*, 30: 1130–1133.

- (195) Zhao T, Severijnen L-A, Weiden M van der, Zheng PP, Oostra BA, Hukema RK, Willemsen R, Kros JM, Bonifati V. (2013) FBXO7 Immunoreactivity in α -Synuclein—Containing Inclusions in Parkinson Disease and Multiple System Atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 72: 482–488.
- (196) Nelson DE, Randle SJ, Laman H. (2013) Beyond ubiquitination: the atypical functions of Fbxo7 and other F-box proteins. *Open Biol*, 3: 130131.
- (197) Randle SJ, Laman H. (2017) Structure and Function of Fbxo7/PARK15 in Parkinson's Disease. *Curr Protein Pept Sci*, 18: 715–724.
- (198) Vingill S, Brockelt D, Lancelin C, Tatenhorst L, Dontcheva G, Preisinger C, Schwedhelm-Domeyer N, Joseph S, Mitkovski M, Goebbels S, Nave K, Schulz JB, Marquardt T, Lingor P, Stegmüller J. (2016) Loss of FBXO 7 (PARK 15) results in reduced proteasome activity and models a parkinsonism-like phenotype in mice. *EMBO J*, 35: 2008–2025.
- (199) Burchell VS, Nelson DE, Sanchez-Martinez A, Delgado-Camprubi M, Ivatt RM, Pogson JH, Randle SJ, Wray S, Lewis PA, Houlden H, Abramov AY, Hardy J, Wood NW, Whitworth AJ, Laman H, Plun-Favreau H. (2013) The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat Neurosci*, 16: 1257–1265.
- (200) Dehay B, Ramirez A, Martinez-Vicente M, Perier C, Canron M-H, Doudnikoff E, Vital A, Vila M, Klein C, Bezdard E. (2012) Loss of P-type ATPase ATP13A2/PARK9 function induces general lysosomal deficiency and leads to Parkinson disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 9611–9616.
- (201) Gusdon AM, Zhu J, Van Houten B, Chu CT. (2012) ATP13A2 regulates mitochondrial bioenergetics through macroautophagy. *Neurobiol Dis*, 45: 962–972.
- (202) Tofaris GK. (2012) Lysosome-dependent pathways as a unifying theme in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 27: 1364–1369.
- (203) Gitler AD, Chesi A, Geddie ML, Strathearn KE, Hamamichi S, Hill KJ, Caldwell KA, Caldwell GA, Cooper AA, Rochet J-C, Lindquist S. (2009) Alpha-synuclein is part of a diverse and highly co... [Nat Genet. 2009] - PubMed result. *Nat Genet*, 41: 308–315.
- (204) Grünewald A, Arns B, Seibler P, Rakovic A, Münchau A, Ramirez A, Sue CM,

- Klein C. (2012) ATP13A2 mutations impair mitochondrial function in fibroblasts from patients with Kufor-Rakeb syndrome. *Neurobiol Aging*, 33: 1843.e1-7.
- (205) Kong SMY, Chan BKK, Park J-S, Hill KJ, Aitken JB, Cottle L, Farghaian H, Cole AR, Lay PA, Sue CM, Cooper AA. (2014) Parkinson's disease-linked human PARK9/ATP13A2 maintains zinc homeostasis and promotes α -Synuclein externalization via exosomes. *Hum Mol Genet*, 23: 2816–2833.
- (206) Fukushima T, Tan X, Luo Y, Kanda H. (2011) Serum vitamins and heavy metals in blood and urine, and the correlations among them in Parkinson's disease patients in China. *Neuroepidemiology*, 36: 240–244.
- (207) Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Kimura A, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T. (2011) Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*, 303: 95–99.
- (208) Jiménez-Jiménez FJ, Fernández-Calle P, Martínez-Vanaclocha M, Herrero E, Molina JA, Vázquez A, Codoceo R. (1992) Serum levels of zinc and copper in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 112: 30–33.
- (209) Guilarte TR. (2011) Manganese and Parkinson's disease: A critical review and new findings. *Cienc e Saude Coletiva*, 16: 4519–4566.
- (210) Pals P, Van Everbroeck B, Grubben B, Viaene MK, Dom R, Van Der Linden C, Santens P, Martin JJ, Cras P. (2003) Case-control study of environmental risk factors for Parkinson's disease in Belgium. *Eur J Epidemiol*, 18: 1133–1142.
- (211) Rentschler G, Covolo L, Haddad AA, Lucchini RG, Zoni S, Broberg K. (2012) ATP13A2 (PARK9) polymorphisms influence the neurotoxic effects of manganese. *Neurotoxicology*, 33: 697–702.
- (212) Pérez-Brangulí F, Mishra HK, Prots I, Havlicek S, Kohl Z, Saul D, Rummel C, Dorca-Arevalo J, Regensburger M, Graef D, Sock E, Blasi J, Groemer TW, Schlötzer-Schrehardt U, Winkler J, Winner B. (2014) Dysfunction of spatacsin leads to axonal pathology in SPG11-linked hereditary spastic paraplegia. *Hum Mol Genet*, 23: 4859–4874.
- (213) Köroğlu Ç, Baysal L, Cetinkaya M, Karasoy H, Tolun A. (2013) DNAJC6 is responsible for juvenile parkinsonism with phenotypic variability. *Parkinsonism Relat Disord*, 19: 320–324.

- (214) Sudhaman S, Prasad K, Behari M, Muthane UB, Juyal RC, Thelma B. (2016) Discovery of a frameshift mutation in podocalyxin-like (PODXL) gene, coding for a neural adhesion molecule, as causal for autosomal-recessive juvenile Parkinsonism. *J Med Genet*, 53: 450–456.
- (215) Khodadadi H, Azcona LJ, Aghamollai V, Omrani MD, Garshasbi M, Taghavi S, Tafakhori A, Shahidi GA, Jamshidi J, Darvish H, Paisán-Ruiz C. (2017) *PTRHD1* (C2orf79) mutations lead to autosomal-recessive intellectual disability and parkinsonism. *Mov Disord*, 32: 287–291.
- (216) Kurian MA, Zhen J, Cheng SY, Li Y, Mordekar SR, Jardine P, Morgan N V., Meyer E, Tee L, Pasha S, Wassmer E, Heales SJR, Gissen P, Reith MEA, Maher ER. (2009) Homozygous loss-of-function mutations in the gene encoding the dopamine transporter are associated with infantile parkinsonism-dystonia. *J Clin Invest*, 119: 1595–1603.
- (217) Puffenberger EG, Jinks RN, Sougnez C, Cibulskis K, Willert RA, Achilly NP, Cassidy RP, Fiorentini CJ, Heiken KF, Lawrence JJ, Mahoney MH, Miller CJ, Nair DT, Politi KA, Worcester KN, Setton RA, Dipiazza R, Sherman EA, Eastman JT, Francklyn C, Robey-Bond S, Rider NL, Gabriel S, Morton DH, Strauss KA. (2012) Genetic mapping and exome sequencing identify variants associated with five novel diseases. *PLoS One*, 7: e28936.
- (218) Kurian MA, Li Y, Zhen J, Meyer E, Hai N, Christen H-J, Hoffmann GF, Jardine P, von Moers A, Mordekar SR, O’Callaghan F, Wassmer E, Wraige E, Dietrich C, Lewis T, Hyland K, Heales S, Sanger T, Gissen P, Assmann BE, Reith MEA, Maher ER. (2011) Clinical and molecular characterisation of hereditary dopamine transporter deficiency syndrome: an observational cohort and experimental study. *Lancet Neurol*, 10: 54–62.
- (219) Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A. (2004) Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase γ mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet*, 364: 875–882.
- (220) Reeve AK, Krishnan KJ, Elson JL, Morris CM, Bender A, Lightowlers RN, Turnbull DM. (2008) Nature of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons. *Am J Hum Genet*, 82: 228–235.

- (221) Luoma PT, Eerola J, Ahola S, Hakonen AH, Hellstrom O, Kivisto KT, Tienari PJ, Suomalainen A. (2007) Mitochondrial DNA polymerase gamma variants in idiopathic sporadic Parkinson disease. *Neurology*, 69: 1152–1159.
- (222) Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, Jaros E, Hersheson JS, Betts J, Klopstock T, Taylor RW, Turnbull DM. (2006) High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet*, 38: 515–517.
- (223) DeBalsi KL, Longley MJ, Hoff KE, Copeland WC. (2017) Synergistic Effects of the in cis T251I and P587L Mitochondrial DNA Polymerase γ Disease Mutations. *J Biol Chem*, 292: 4198–4209.
- (224) Murgai AA, Jog MS. (2018) Can heterozygotes of autosomal recessive disorders have clinical manifestations? *Mov Disord*, 33: 1368–1369.
- (225) Hsieh P, Wang C, Tsai C, Yeh Y, Lee YS, Wu Y. (2019) POLG R964C and GBA L444P mutations in familial Parkinson's disease: Case report and literature review. *Brain Behav*, 9: e01281.
- (226) Delgado-Alvarado M, de la Riva P, Jiménez-Urbieta H, Gago B, Gabilondo A, Bornstein B, Rodríguez-Oroz MC. (2015) Parkinsonism, cognitive deficit and behavioural disturbance caused by a novel mutation in the polymerase gamma gene. *J Neurol Sci*, 350: 93–97.
- (227) Tzoulis C, Tran GT, Schwarzmüller T, Specht K, Haugarvoll K, Balafkan N, Lilleng PK, Miletic H, Biermann M, Bindoff LA. (2013) Severe nigrostriatal degeneration without clinical parkinsonism in patients with polymerase gamma mutations. *Brain*, 136: 2393–2404.
- (228) Davis AA, Andruska KM, Benitez BA, Racette BA, Perlmutter JS, Cruchaga C. (2016) Variants in GBA, SNCA, and MAPT influence Parkinson disease risk, age at onset, and progression. *Neurobiol Aging*, 37: 209.e1-209.e7.
- (229) Evangelou E, Maraganore DM, Ioannidis JPA. (2007) Meta-analysis in genome-wide association datasets: strategies and application in Parkinson disease. *PLoS One*, 2: e196.
- (230) Farrer MJ, Stone JT, Lin C-H, Dächsel JC, Hulihan MM, Haugarvoll K, Ross OA, Wu R-M. (2007) Lrrk2 G2385R is an ancestral risk factor for Parkinson's disease in Asia. *Parkinsonism Relat Disord*, 13: 89–92.

- (231) Zheng Y, Liu Y, Wu Q, Hong H, Zhou H, Chen J, Wang H, Xian W, Li J, Liu Z, Pei Z, Chen L. (2011) Confirmation of LRRK2 S1647T variant as a risk factor for Parkinson's disease in Southern China. *Eur J Neurol*, 18: 538–540.
- (232) Barkhuizen M, Anderson DG, Grobler AF. (2016) Advances in GBA-associated Parkinson's disease - Pathology, presentation and therapies. *Neurochem Int*, 93: 6–25.
- (233) Sharp ME, Marder KS, Côté L, Clark LN, Nichols WC, Vonsattel J-P, Alcalay RN. (2014) Parkinson's disease with Lewy bodies associated with a heterozygous PARKIN dosage mutation. *Mov Disord*, 29: 566–568.
- (234) Khan NL, Valente EM, Bentivoglio AR, Wood NW, Albanese A, Brooks DJ, Piccini P. (2002) Clinical and subclinical dopaminergic dysfunction in PARK6-linked parkinsonism: An18F-dopa PET study. *Ann Neurol*, 52: 849–853.
- (235) Gandhi S, Muqit MMK, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Hargreaves I, Heales S, Ganguly M, Parsons L, Lees AJ, Latchman DS, Holton JL, Wood NW, Revesz T. (2006) PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain*, 129: 1720–1731.
- (236) Reed X, Bandrés-Ciga S, Blauwendraat C, Cookson MR. (2019) The role of monogenic genes in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 124: 230–239.
- (237) Grabowski GA. (2008) Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet*, 372: 1263–1271.
- (238) Goker-Alpan O, Schiffmann R, LaMarca ME, Nussbaum RL, McInerney-Leo A, Sidransky E. (2004) Parkinsonism among Gaucher disease carriers. *J Med Genet*, 41: 937–940.
- (239) Sidransky E. (2004) Gaucher disease: complexity in a “simple” disorder. *Mol Genet Metab*, 83: 6–15.
- (240) Hruska KS, LaMarca ME, Scott CR, Sidransky E. (2008) Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA). *Hum Mutat*, 29: 567–583.
- (241) Clark LN, Ross BM, Wang Y, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K. (2007) Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology*, 69: 1270–1277.

- (242) Clark LN, Kartsaklis LA, Wolf Gilbert R, Dorado B, Ross BM, Kisselev S, Verbitsky M, Mejia-Santana H, Cote LJ, Andrews H, Vonsattel J-P, Fahn S, Mayeux R, Honig LS, Marder K. (2009) Association of glucocerebrosidase mutations with dementia with lewy bodies. *Arch Neurol*, 66: 578–583.
- (243) Gan-Or Z, Amshalom I, Kilarski LL, Bar-Shira A, Gana-Weisz M, Mirelman A, Marder K, Bressman S, Giladi N, Orr-Urtreger A. (2015) Differential effects of severe vs mild GBA mutations on Parkinson disease. *Neurology*, 84: 880–887.
- (244) Lee AJ, Wang Y, Alcalay RN, Mejia-Santana H, Saunders-Pullman R, Bressman S, Corvol J-C, Brice A, Lesage S, Mangone G, Tolosa E, Pont-Sunyer C, Vilas D, Schüle B, Kausar F, Foroud T, Berg D, Brockmann K, Goldwurm S, Siri C, Asselta R, Ruiz-Martinez J, Mondragón E, Marras C, Ghate T, Giladi N, Mirelman A, Marder K, Michael J. Fox LRRK2 Cohort Consortium MJ, Consortium LC. (2017) Penetrance estimate of LRRK2 p.G2019S mutation in individuals of non-Ashkenazi Jewish ancestry. *Mov Disord*, 32: 1432–1438.
- (245) Velayati A, Yu WH, Sidransky E. (2010) The Role of Glucocerebrosidase Mutations in Parkinson Disease and Lewy Body Disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 10: 190–198.
- (246) Balestrino R, Schapira AH V. (2018) Glucocerebrosidase and Parkinson Disease: Molecular, Clinical, and Therapeutic Implications. *Neurosci*, 107385841774887.
- (247) Brockmann K, Berg D. (2014) The significance of GBA for Parkinson’s disease. *J Inherit Metab Dis*, 37: 643–648.
- (248) Gegg ME, Schapira AH V. (2018) The role of glucocerebrosidase in Parkinson disease pathogenesis. *FEBS J*,
- (249) Kono S, Shirakawa K, Ouchi Y, Sakamoto M, Ida H, Sugiura T, Tomiyama H, Suzuki H, Takahashi Y, Miyajima H, Hattori N, Mizuno Y. (2007) Dopaminergic neuronal dysfunction associated with parkinsonism in both a Gaucher disease patient and a carrier. *J Neurol Sci*, 252: 181–184.
- (250) Lin MK, Farrer MJ. (2014) Genetics and genomics of Parkinson’s disease. *Genome Med*, 6: 48.
- (251) Mazzulli JR, Xu Y-H, Sun Y, Knight AL, McLean PJ, Caldwell GA, Sidransky E, Grabowski GA, Krainc D. (2011) Gaucher Disease Glucocerebrosidase and α -Synuclein Form a Bidirectional Pathogenic Loop in Synucleinopathies. *Cell*, 146:

37–52.

- (252) Schapira AH, Jenner P. (2011) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord*, 26: 1049–1055.
- (253) Xu YH, Sun Y, Ran H, Quinn B, Witte D, Grabowski GA. (2011) Accumulation and distribution of α -synuclein and ubiquitin in the CNS of Gaucher disease mouse models. *Mol Genet Metab*, 102: 436–447.
- (254) Ascherio A, Schwarzschild MA. (2016) The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol*, 15: 1257–1272.
- (255) Schrag A, Ben-Shlomo Y, Quinn NP. (2000) Cross sectional prevalence survey of idiopathic Parkinson's disease and Parkinsonism in London. *BMJ*, 321: 21–22.
- (256) Ueno T, Kume K. (2014) Functional characterization of dopamine transporter in vivo using *Drosophila melanogaster* behavioral assays. *Front Behav Neurosci*, 8: 303.
- (257) Deik A, Saunders-Pullman R, Luciano MS. (2012) Substance of abuse and movement disorders: complex interactions and comorbidities. *Curr Drug Abuse Rev*, 5: 243–253.
- (258) Vaughan RA, Foster JD. (2013) Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends Pharmacol Sci*, 34: 489–496.
- (259) Verma V. (2015) Classic Studies on the Interaction of Cocaine and the Dopamine Transporter. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 13: 227–238.
- (260) Lloyd SA, Faherty CJ, Smeyne RJ. (2006) Adult and in utero exposure to cocaine alters sensitivity to the parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience*, 137: 905–913.
- (261) Curtin K, Fleckenstein AE, Robison RJ, Crookston MJ, Smith KR, Hanson GR. (2015) Methamphetamine/amphetamine abuse and risk of Parkinson's disease in Utah: a population-based assessment. *Drug Alcohol Depend*, 146: 30–38.
- (262) Kakish J, Lee D, Lee JS. (2015) Drugs That Bind to α -Synuclein: Neuroprotective or Neurotoxic? *ACS Chem Neurosci*, 6: 1930–1940.
- (263) Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24: 197–211.
- (264) Qin Y, Ouyang Q, Pablo J, Mash DC. (2005) Cocaine abuse elevates alpha-

- synuclein and dopamine transporter levels in the human striatum. *Neuroreport*, 16: 1489–1493.
- (265) Molnar MJ, Bencsik P. (2006) Establishing a Neurological-Psychiatric Biobank: Banking, informatics, ethics. *Cell Immunol*, 244: 101–104.
- (266) Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, Thibault J, Banks E, Garimella K V., Altshuler D, Gabriel S, DePristo MA. (2013) From FastQ Data to High-Confidence Variant Calls: The Genome Analysis Toolkit Best Practices Pipeline. In: *Current Protocols in Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2013.; pp. 11.10.1-11.10.33.
- (267) Cingolani P, Platts A, Wang LL, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*, 6: 80–92.
- (268) Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Hoover J, Jang W, Katz K, Ovetsky M, Riley G, Sethi A, Tully R, Villamarin-Salomon R, Rubinstein W, Maglott DR. (2016) ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*, 44: D862-8.
- (269) Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. (2015) Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 17: 405–423.
- (270) Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST, Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. (2011) American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med*, 13: 680–685.
- (271) Liu X, Jian X, Boerwinkle E. (2013) dbNSFP v2.0: A Database of Human Non-synonymous SNVs and Their Functional Predictions and Annotations. *Hum Mutat*, 34: E2393–E2402.
- (272) Nichols WC, Elsaesser VE, Pankratz N, Pauciulo MW, Marek DK, Halter CA,

- Rudolph A, Shults CW, Foroud T, Parkinson Study Group-PROGENI Investigators. (2007) LRRK2 mutation analysis in Parkinson disease families with evidence of linkage to PARK8. *Neurology*, 69: 1737–1744.
- (273) Gustavsson EK, Trinh J, Guella I, Vilariño-Güell C, Appel-Cresswell S, Stoessl AJ, Tsui JK, McKeown M, Rajput A, Rajput AH, Aasly JO, Farrer MJ. (2015) *DNAJC13* genetic variants in parkinsonism. *Mov Disord*, 30: 273–278.
- (274) Greggio E, Jain S, Kingsbury A, Bandopadhyay R, Lewis P, Kaganovich A, van der Brug MP, Beilina A, Blackinton J, Thomas KJ, Ahmad R, Miller DW, Kesavapany S, Singleton A, Lees A, Harvey RJ, Harvey K, Cookson MR. (2006) Kinase activity is required for the toxic effects of mutant LRRK2/dardarin. *Neurobiol Dis*, 23: 329–341.
- (275) Sen S, Webber PJ, West AB. (2009) Dependence of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) kinase activity on dimerization. *J Biol Chem*, 284: 36346–36356.
- (276) Berger Z, Smith KA, Lavoie MJ. (2010) Membrane localization of LRRK2 is associated with increased formation of the highly active LRRK2 dimer and changes in its phosphorylation. *Biochemistry*, 49: 5511–5523.
- (277) Barkhuizen M, Anderson DG, van der Westhuizen FH, Grobler AF. (2017) A molecular analysis of the GBA gene in Caucasian South Africans with Parkinson's disease. *Mol Genet genomic Med*, 5: 147–156.
- (278) Benitez BA, Davis AA, Jin SC, Ibanez L, Ortega-Cubero S, Pastor P, Choi J, Cooper B, Perlmutter JS, Cruchaga C. (2016) Resequencing analysis of five Mendelian genes and the top genes from genome-wide association studies in Parkinson's Disease. *Mol Neurodegener*, 11: 29.
- (279) Paisán-Ruiz C, Lewis PA, Singleton AB. (2013) LRRK2: Cause, risk, and mechanism. *J Parkinsons Dis*, 3: 85–103.
- (280) Wang F, Feng X, Ma J, Zou H, Chan P. (2006) A common A340T variant in PINK1 gene associated with late-onset Parkinson's disease in Chinese. *Neurosci Lett*, 410: 121–125.
- (281) Puschmann A, Fiesel FC, Caulfield TR, Hudec R, Ando M, Truban D, Hou X, Ogaki K, Heckman MG, James ED, Swanberg M, Jimenez-Ferrer I, Hansson O, Opala G, Siuda J, Boczarska-Jedynak M, Friedman A, Kozirowski D, Aasly JO, Lynch T, Mellick GD, Mohan M, Silburn PA, Sanotsky Y, Vilariño-Güell C,

- Farrer MJ, Chen L, Dawson VL, Dawson TM, Wszolek ZK, Ross OA, Springer W, Springer W. (2017) Heterozygous PINK1 p.G411S increases risk of Parkinson's disease via a dominant-negative mechanism. *Brain*, 140: 98–117.
- (282) Ross JP, Dupre N, Dauvilliers Y, Strong S, Ambalavanan A, Spiegelman D, Dionne-Laporte A, Pourcher E, Langlois M, Boivin M, Leblond CS, Dion PA, Rouleau GA, Gan-Or Z. (2016) Analysis of DNAJC13 mutations in French-Canadian/French cohort of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 45: 212.e13-212.e17.
- (283) Vilariño-Güell C, Rajput A, Milnerwood AJ, Shah B, Szu-Tu C, Trinh J, Yu I, Encarnacion M, Munsie LN, Tapia L, Gustavsson EK, Chou P, Tatarnikov I, Evans DM, Pishotta FT, Volta M, Beccano-Kelly D, Thompson C, Lin MK, Sherman HE, Han HJ, Guenther BL, Wasserman WW, Bernard V, Ross CJ, Appel-Cresswell S, Stoessl AJ, Robinson CA, Dickson DW, Ross OA, Wszolek ZK, Aasly JO, Wu R-M, Hentati F, Gibson RA, McPherson PS, Girard M, Rajput M, Rajput AH, Farrer MJ. (2014) DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum Mol Genet*, 23: 1794–1801.
- (284) Ozes B, Karagoz N, Schüle R, Rebelo A, Sobrido M-J, Harmuth F, Synofzik M, Pascual SIP, Colak M, Ciftci-Kavaklioglu B, Kara B, Ordóñez-Ugalde A, Quintáns B, Gonzalez MA, Soysal A, Zuchner S, Battaloglu E. (2017) PLA2G6 mutations associated with a continuous clinical spectrum from neuroaxonal dystrophy to hereditary spastic paraplegia. *Clin Genet*, 92: 534–539.
- (285) Malley KR, Koroleva O, Miller I, Sanishvili R, Jenkins CM, Gross RW, Korolev S. (2018) The structure of iPLA2 β reveals dimeric active sites and suggests mechanisms of regulation and localization. *Nat Commun*, 9: 765.
- (286) Petersen MS, Guella I, Bech S, Gustavsson E, Farrer MJ. (2015) Parkinson's disease, genetic variability and the Faroe Islands. *Parkinsonism Relat Disord*, 21: 75–78.
- (287) Zhao X, Shao Z, Zhang Y, Liu F, Liu Z, Liu Z. (2018) Ceruloplasmin in Parkinson's disease and the nonmotor symptoms. *Brain Behav*, 8: e00995.
- (288) Abbas N, Lücking CB, Ricard S, Dürr A, Bonifati V, De Michele G, Bouley S, Vaughan JR, Gasser T, Marconi R, Broussolle E, Brefel-Courbon C, Harhangi BS, Oostra BA, Fabrizio E, Böhme GA, Pradier L, Wood NW, Filla A, Meco G,

- Denefle P, Agid Y, Brice A. (1999) A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet*, 8: 567–574.
- (289) Zabalza R, Nurminen A, Kaguni LS, Garesse R, Gallardo ME, Bornstein B. (2014) Co-occurrence of four nucleotide changes associated with an adult mitochondrial ataxia phenotype. *BMC Res Notes*, 7: 883.
- (290) Hynynen J, Pokka T, Komulainen-Ebrahim J, Myllynen P, Kärppä M, Pylvänen L, Kälviäinen R, Sokka A, Jyrkilä A, Lähdetie J, Haataja L, Mäkitalo A, Ylikotila P, Eriksson K, Haapala P, Ansakorpi H, Hinttala R, Vieira P, Majamaa K, Rantala H, Uusimaa J. (2018) Variants p.Q1236H and p.E1143G in mitochondrial DNA polymerase gamma *POLG1* are not associated with increased risk for valproate-induced hepatotoxicity or pancreatic toxicity: A retrospective cohort study of patients with epilepsy. *Epilepsia*, 59: 2125–2136.
- (291) Scuderi C, Borgione E, Castello F, Lo Giudice M, Santa Paola S, Giambirtone M, Di Blasi FD, Elia M, Amato C, Città S, Gagliano C, Barbarino G, Vitello GA, Musumeci SA. (2015) The in cis T251I and P587L *POLG1* base changes: Description of a new family and literature review. *Neuromuscul Disord*, 25: 333–339.
- (292) Davidzon G, Greene P, Mancuso M, Klos KJ, Ahlskog JE, Hirano M, DiMauro S. (2006) Early-onset familial parkinsonism due to *POLG* mutations. *Ann Neurol*, 59: 859–862.
- (293) Phillips J, Courel S, Rebelo AP, Bis-Brewer DM, Bardakjian T, Dankwa L, Hamedani AG, Züchner S, Scherer SS. (2019) *POLG* mutations presenting as Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*, 24: 213–218.
- (294) Aitken H, Gorman G, McFarland R, Roberts M, Taylor RW, Turnbull DM. (2009) Clinical Reasoning: Blurred vision and dancing feet: Restless legs syndrome presenting in mitochondrial disease. *Neurology*, 72: e86–e90.
- (295) Bhatia KP, Bain P, Bajaj N, Elble RJ, Hallett M, Louis ED, Raethjen J, Stamelou M, Testa CM, Deuschl G, Tremor Task Force of the International Parkinson and Movement Disorder Society. (2018) Consensus Statement on the classification of tremors. from the task force on tremor of the International Parkinson and

- Movement Disorder Society. *Mov Disord*, 33: 75–87.
- (296) Darcourt J, Booij J, Tatsch K, Varrone A, Vander Borgh T, Kapucu ÖL, Någren K, Nobili F, Walker Z, Van Laere K. (2010) EANM procedure guidelines for brain neurotransmission SPECT using 123I-labelled dopamine transporter ligands, version 2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 37: 443–450.
- (297) Kagi G, Bhatia KP, Tolosa E. (2010) The role of DAT-SPECT in movement disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81: 5–12.
- (298) Varrone A, Dickson JC, Tossici-Bolt L, Sera T, Asenbaum S, Booij J, Kapucu OL, Kluge A, Knudsen GM, Koulibaly PM, Nobili F, Pagani M, Sabri O, Vander Borgh T, Van Laere K, Tatsch K. (2013) European multicentre database of healthy controls for [123I]FP-CIT SPECT (ENC-DAT): age-related effects, gender differences and evaluation of different methods of analysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 40: 213–227.
- (299) Shulskaya M V., Shadrina MI, Fedotova EY, Abramychева NY, Limborska SA, Illarioshkin SN, Slominsky PA. (2017) Second mutation in PARK2 is absent in patients with sporadic Parkinson's disease and heterozygous exonic deletions/duplications in parkin gene. *Int J Neurosci*, 127: 781–784.
- (300) Pankratz N, Dumitriu A, Hetrick KN, Sun M, Latourelle JC, Wilk JB, Halter C, Doheny KF, Gusella JF, Nichols WC, Myers RH, Foroud T, DeStefano AL. (2011) Copy number variation in familial parkinson disease. *PLoS One*, 6:.
- (301) Pentelényi K, Reményi V, Gal A, Milley GM, Csoz A, Mende BG, Molnar MJ. (2014) Asian-specific mitochondrial genome polymorphism (9-bp deletion) in Hungarian patients with mitochondrial disease. *Mitochondrial DNA*, 27: 1–4.
- (302) Spataro N, Rodríguez JA, Navarro A, Bosch E. (2017) Properties of human disease genes and the role of genes linked to Mendelian disorders in complex disease aetiology. *Hum Mol Genet*, 26: 489–500.
- (303) Sardi SP, Viel C, Clarke J, Treleaven CM, Richards AM, Park H, Olszewski MA, Dodge JC, Marshall J, Makino E, Wang B, Sidman RL, Cheng SH, Shihabuddin LS. (2017) Glucosylceramide synthase inhibition alleviates aberrations in synucleinopathy models. *Proc Natl Acad Sci*, 114: 2699–2704.
- (304) Keogh MJ, Wei W, Aryaman J, Wilson I, Talbot K, Turner MR, McKenzie C-A, Troakes C, Attems J, Smith C, Sarraj S Al, Morris CM, Ansorge O, Pickering-

- Brown S, Jones N, Ironside JW, Chinnery PF. (2018) Oligogenic genetic variation of neurodegenerative disease genes in 980 postmortem human brains. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 89: 813–816.
- (305) Lubbe SJ, Escott-Price V, Gibbs JR, Nalls MA, Bras J, Price TR, Nicolas A, Jansen IE, Mok KY, Pittman AM, Tomkins JE, Lewis PA, Noyce AJ, Lesage S, Sharma M, Schiff ER, Levine AP, Brice A, Gasser T, Hardy J, Heutink P, Wood NW, Singleton AB, Williams NM, Morris HR, for International Parkinson's Disease Genomics Consortium for IPDG. (2016) Additional rare variant analysis in Parkinson's disease cases with and without known pathogenic mutations: evidence for oligogenic inheritance. *Hum Mol Genet*, 25: 5483–5489.
- (306) Ferese R, Scala S, Biagioni F, Giardina E, Zampatti S, Modugno N, Colonnese C, Storto M, Fornai F, Novelli G, Ruggieri S, Gambardella S. (2018) Heterozygous PLA2G6 Mutation Leads to Iron Accumulation Within Basal Ganglia and Parkinson's Disease. *Front Neurol*, 9: 536.
- (307) Makovac E, Cercignani M, Serra L, Torso M, Spanò B, Petrucci S, Ricciardi L, Ginevrino M, Caltagirone C, Bentivoglio AR, Valente EM, Bozzali M. (2016) Brain Connectivity Changes in Autosomal Recessive Parkinson Disease: A Model for the Sporadic Form. *PLoS One*, 11: e0163980.
- (308) Clark LN, Afridi S, Karlins E, Wang Y, Mejia-santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ. (2006) Case-Control Study of the Parkin Gene in Early-Onset Parkinson Disease. *Arch Neurol*, 63: 548–552.
- (309) Kay DM, Stevens CF, Hamza TH, Montimurro JS, Zabetian CP, Factor SA, Samii A, Griffith A, Roberts JW, Molho ES, Higgins DS, Gancher S, Moses L, Zarepari S, Poorkaj P, Bird T, Nutt J, Schellenberg GD, Payami H. (2010) A comprehensive analysis of deletions, duplications, and copy number variations in PARK2. *Neurology*, 75: 1189–1194.
- (310) Lincoln SJ, Maraganore DM, Lesnick TG, Bounds R, Andrade M de, Bower JH, Hardy JA, Farrer MJ. (2003) Parkin Variants in North American Parkinson's Disease: Cases and Controls. *Mov Disord*, 18: 1306–1311.
- (311) Guo JF, Zhang XW, Nie LL, Zhang HN, Liao B, Li J, Wang L, Yan XX, Tang BS. (2010) Mutation analysis of Parkin, PINK1 and DJ-1 genes in Chinese patients with sporadic early onset parkinsonism. *J Neurol*, 257: 1170–1175.

- (312) West A, Periquet M, Lincoln S, Lücking CB, Nicholl D, Bonifati V, Rawal N, Gasser T, Lohmann E, Deleuze JF, Maraganore D, Levey A, Wood N, Dürr A, Hardy J, Brice A, Farrer M. (2002) Complex relationship between Parkin mutations and Parkinson disease. *Am J Med Genet - Neuropsychiatr Genet*, 114: 584–591.
- (313) Hilker R, Klein C, Ghaemi M, Kis B, Strotmann T, Ozelius LJ, Lenz O, Vieregge P, Herholz K, Heiss W-D, Pramstaller PP. (2001) Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial Parkinsonism associated with mutations in the Parkin gene. *Ann Neurol*, 49: 367–376.
- (314) Benbunan BR, Korczyn AD, Giladi N. (2004) Parkin mutation associated parkinsonism and cognitive decline, comparison to early onset Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 111: 47–57.
- (315) Ricciardi L, Petrucci S, Guidubaldi A, Ialongo T, Serra L, Ferraris A, Spanò B, Bozzali M, Valente EM, Bentivoglio AR. (2014) Phenotypic variability of PINK1 expression: 12 Years' clinical follow-up of two Italian families. *Mov Disord*, 29: 1561–1566.
- (316) Lu C-S, Lai S-C, Wu R-M, Weng Y-H, Huang C-L, Chen R-S, Chang H-C, Wu-Chou Y-H, Yeh T-H. (2012) PLA2G6 mutations in PARK14-linked young-onset parkinsonism and sporadic Parkinson's disease. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet*, 159B: 183–191.
- (317) Bower MA, Bushara K, Dempsey MA, Das S, Tuite PJ. (2011) Novel mutations in siblings with later-onset PLA2G6-associated neurodegeneration (PLAN). *Mov Disord*, 26: 1766–1767.
- (318) Klein C, Westenberger A. (2012) Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a008888.
- (319) Orsucci D, Caldarazzo Ienco E, Mancuso M, Siciliano G. (2011) POLG1-Related and other "Mitochondrial Parkinsonisms": an Overview. *J Mol Neurosci*, 44: 17–24.
- (320) Tang S, Wang J, Lee N-C, Milone M, Halberg MC, Schmitt ES, Craigen WJ, Zhang W, Wong L-JC. (2011) Mitochondrial DNA polymerase mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum. *J Med Genet*, 48: 669–681.
- (321) Burusnukul P, de los Reyes EC. (2009) Phenotypic Variations in 3 Children With

- POLG1 Mutations. *J Child Neurol*, 24: 482–486.
- (322) Blok MJ, van den Bosch BJ, Jongen E, Hendrickx A, de Die-Smulders CE, Hoogendijk JE, Brusse E, de Visser M, Poll-The BT, Bierau J, de Coo IF, Smeets HJ. (2009) The unfolding clinical spectrum of POLG mutations. *J Med Genet*, 46: 776–785.
- (323) Harris MO, Walsh LE, Hattab EM, Golomb MR. (2010) Is it ADEM, POLG, or both? *Arch Neurol*, 67: 493–496.
- (324) Da Pozzo P, Cardaioli E, Rubegni A, Gallus GN, Malandrini A, Rufa A, Battisti C, Carluccio MA, Rocchi R, Giannini F, Bianchi A, Mancuso M, Siciliano G, Dotti MT, Federico A. (2017) Novel POLG mutations and variable clinical phenotypes in 13 Italian patients. *Neurol Sci*, 38: 563–570.
- (325) Wilke C, Pomper JK, Biskup S, Puskás C, Berg D, Synofzik M. (2016) Atypical parkinsonism in C9orf72 expansions: a case report and systematic review of 45 cases from the literature. *J Neurol*, 263: 558–574.
- (326) Floris G, Borghero G, Di Stefano F, Melis R, Puddu R, Fadda L, Murru MR, Corongiu D, Cuccu S, Tranquilli S, Cannas A, Marrosu MG, Chiò A, Marrosu F. (2016) Phenotypic variability related to C9orf72 mutation in a large Sardinian kindred. *Amyotroph Lateral Scler Front Degener*, 17: 245–248.
- (327) Alavi A, Malakouti Nejad M, Shahidi G, Elahi E. (2017) Mutations in C19orf12 and intronic repeat expansions in C9orf72 not observed in Iranian Parkinson's disease patients. *Neurobiol Aging*, 54: 214.e11-214.e12.
- (328) Chen X, Chen Y, Wei Q, Ou R, Cao B, Zhao B, Shang H-F. (2016) C9ORF72 repeat expansions in Chinese patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Neural Transm*, 123: 1341–1345.
- (329) Majounie E, Abramzon Y, Renton AE, Keller MF, Traynor BJ, Singleton AB. (2012) Large C9orf72 repeat expansions are not a common cause of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 33: 2527.e1-2.
- (330) Dejesus-Hernandez M, Rayaprolu S, Soto-Ortolaza AI, Rutherford NJ, Heckman MG, Traynor S, Strongosky A, Graff-Radford N, Van Gerpen J, Uitti RJ, Shih JJ, Lin S-C, Wszolek ZK, Rademakers R, Ross OA. (2013) Analysis of the C9orf72 repeat in Parkinson's disease, essential tremor and restless legs syndrome. *Parkinsonism Relat Disord*, 19: 198–201.

- (331) Cannas A, Solla P, Borghero G, Floris GL, Chio A, Mascia MM, Modugno N, Muroli A, Orofino G, Di Stefano F, Calvo A, Moglia C, Restagno G, Meloni M, Farris R, Ciaccio D, Puddu R, Vacca MI, Melis R, Murru MR, Tranquilli S, Corongiu D, Rolesu M, Cuccu S, Marrosu MG, Marrosu F. (2015) C9ORF72 intermediate repeat expansion in patients affected by atypical parkinsonian syndromes or Parkinson's disease complicated by psychosis or dementia in a Sardinian population. *J Neurol*, 262: 2498–2503.
- (332) Lesage S, Le Ber I, Condroyer C, Broussolle E, Gabelle A, Thobois S, Pasquier F, Mondon K, Dion PA, Rochefort D, Rouleau GA, Dürr A, Brice A, French Parkinson's Disease Genetics Study Group. (2013) C9orf72 repeat expansions are a rare genetic cause of parkinsonism. *Brain*, 136: 385–391.
- (333) Nuytemans K, Bademci G, Kohli MM, Beecham GW, Wang L, Young JI, Nahab F, Martin ER, Gilbert JR, Benatar M, Haines JL, Scott WK, Züchner S, Pericak-Vance MA, Vance JM. (2013) C9ORF72 intermediate repeat copies are a significant risk factor for Parkinson disease. *Ann Hum Genet*, 77: 351–363.
- (334) Jiao B, Guo J-F, Wang Y-Q, Yan X-X, Zhou L, Liu X-Y, Zhang F-F, Zhou Y-F, Xia K, Tang B-S, Shen L. (2013) C9orf72 mutation is rare in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and essential tremor in China. *Front Cell Neurosci*, 7: 164.
- (335) Nuytemans K, Inchausti V, Beecham GW, Wang L, Dickson DW, Trojanowski JQ, Lee VM-Y, Mash DC, Frosch MP, Foroud TM, Honig LS, Montine TJ, Dawson TM, Martin ER, Scott WK, Vance JM. (2014) Absence of C9ORF72 expanded or intermediate repeats in autopsy-confirmed Parkinson's disease. *Mov Disord*, 29: 827–830.
- (336) Cooper-Knock J, Hewitt C, Highley JR, Brockington A, Milano A, Man S, Martindale J, Hartley J, Walsh T, Gelsthorpe C, Baxter L, Forster G, Fox M, Bury J, Mok K, McDermott CJ, Traynor BJ, Kirby J, Wharton SB, Ince PG, Hardy J, Shaw PJ. (2012) Clinico-pathological features in amyotrophic lateral sclerosis with expansions in C9ORF72. *Brain*, 135: 751–764.
- (337) Mahoney CJ, Beck J, Rohrer JD, Lashley T, Mok K, Shakespeare T, Yeatman T, Warrington EK, Schott JM, Fox NC, Rossor MN, Hardy J, Collinge J, Revesz T, Mead S, Warren JD. (2012) Frontotemporal dementia with the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion: clinical, neuroanatomical and neuropathological

- features. *Brain*, 135: 736–750.
- (338) Simón-Sánchez J, Dopfer EGP, Cohn-Hokke PE, Hukema RK, Nicolaou N, Seelaar H, de Graaf JRA, de Koning I, van Schoor NM, Deeg DJH, Smits M, Raaphorst J, van den Berg LH, Schelhaas HJ, De Die-Smulders CEM, Majoor-Krakauer D, Rozemuller AJM, Willemsen R, Pijnenburg YAL, Heutink P, van Swieten JC. (2012) The clinical and pathological phenotype of C9ORF72 hexanucleotide repeat expansions. *Brain*, 135: 723–735.
- (339) Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L, Kalimo H, Paetau A, Abramzon Y, Remes AM, Kaganovich A, Scholz SW, Duckworth J, Ding J, Harmer DW, Hernandez DG, Johnson JO, Mok K, Rytten M, Trabzuni D, Guerreiro RJ, Orrell RW, Neal J, Murray A, Pearson J, Jansen IE, Sondervan D, Seelaar H, Blake D, Young K, Halliwell N, Callister JB, Toulson G, Richardson A, Gerhard A, Snowden J, Mann D, Neary D, Nalls MA, Peuralinna T, Jansson L, Isoviita VM, Kaivorinne AL, Hölttä-Vuori M, Ikonen E, Sulkava R, Benatar M, Wu J, Chiò A, Restagno G, Borghero G, Sabatelli M; ITALSGEN Consortium, Heckerman D, Rogaeva E, Zinman L, Rothstein JD, Sendtner M, Drepper C, Eichler EE, Alkan C, Abdullaev Z, Pack SD, Dutra A, Pak E, Hardy J, Singleton A, Williams NM, Heutink P, Pickering-Brown S, Morris HR, Tienari PJ, Traynor BJ. (2011) A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72: 257–268.
- (340) Li Y-C, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol*, 11: 2453–2465.
- (341) Siciliano CA, Fordahl SC, Jones SR. (2016) Cocaine Self-Administration Produces Long-Lasting Alterations in Dopamine Transporter Responses to Cocaine. *J Neurosci*, 36: 7807–7816.
- (342) Büttner A. (2011) Review: The neuropathology of drug abuse. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 37: 118–134.
- (343) Malison RT, Best SE, van Dyck CH, McCance EF, Wallace EA, Laruelle M, Baldwin RM, Seibyl JP, Price LH, Kosten TR, Innis RB. (1998) Elevated striatal dopamine transporters during acute cocaine abstinence as measured by [123I] beta-

- CIT SPECT. *Am J Psychiatry*, 155: 832–834.
- (344) Bauer LO. (1996) Resting hand tremor in abstinent cocaine-dependent, alcohol-dependent, and polydrug-dependent patients. *Alcohol Clin Exp Res*, 20: 1196–1201.
- (345) Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ, Dewey SL, Wolf AP. (1993) Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse*, 14: 169–177.
- (346) Asser A, Taba P. (2015) Psychostimulants and movement disorders. *Front Neurol*, 6: 75.
- (347) Sordo L, Indave BI, Barrio G, Degenhardt L, de la Fuente L, Bravo MJ. (2014) Cocaine use and risk of stroke: a systematic review. *Drug Alcohol Depend*, 142: 1–13.
- (348) Bartzokis G, Beckson M, Lu PH, Edwards N, Rapoport R, Wiseman E, Bridge P. (2000) Age-related brain volume reductions in amphetamine and cocaine addicts and normal controls: implications for addiction research. *Psychiatry Res*, 98: 93–102.
- (349) Romero MJ, Asensio S, Palau C, Sanchez A, Romero FJ. (2010) Cocaine addiction: diffusion tensor imaging study of the inferior frontal and anterior cingulate white matter. *Psychiatry Res*, 181: 57–63.
- (350) Di Rocco A, Nasser S, Werner P. (2006) Inhaled Cocaine Used to Relieve “Off” Periods in Patients With Parkinson Disease and Unpredictable Motor Fluctuations. *J Clin Psychopharmacol*, 26: 689–690.
- (351) Callaghan RC, Cunningham JK, Sykes J, Kish SJ. (2012) Increased risk of Parkinson’s disease in individuals hospitalized with conditions related to the use of methamphetamine or other amphetamine-type drugs. *Drug Alcohol Depend*, 120: 35–40.
- (352) Lim TT, Ahmed A, Itin I, Gostkowski M, Rudolph J, Cooper S, Fernandez HH. (2013) Is 6 Months of Neuroleptic Withdrawal Sufficient to Distinguish Drug-Induced Parkinsonism From Parkinson’s Disease? *Int J Neurosci*, 123: 170–174.
- (353) Erro R, Bhatia KP, Tinazzi M. (2015) Parkinsonism following neuroleptic exposure: A double-hit hypothesis? *Mov Disord*, 30: 780–785.
- (354) Lin C-HH, Wu R-MM, Tai C-HH, Chen M-LL, Hu F-CC. (2011) *Lrrk2 S1647T*

- and BDNF V66M interact with environmental factors to increase risk of Parkinson's disease. *Park Relat Disord*, 17: 84–88.
- (355) Peeraully T, Tan EK. (2012) Genetic variants in Sporadic Parkinson's Disease: East vs West. *Parkinsonism Relat Disord*, 18: S63–S65.
- (356) Haberstick BC, Boardman JD, Wagner B, Smolen A, Hewitt JK, Killea-Jones LA, Tabor J, Halpern CT, Brummett BH, Williams RB, Siegler IC, Hopfer CJ, Harris KM. (2016) Depression, Stressful Life Events, and the Impact of Variation in the Serotonin Transporter: Findings from the National Longitudinal Study of Adolescent to Adult Health (Add Health). *PLoS One*, 11:.
- (357) Klein C. (2005) Movement disorders: Classifications. *J Inherit Metab Dis*, 28: 425–439.
- (358) Zhang Y, Shu L, Zhou X, Pan H, Xu Q, Guo J, Tang B, Sun Q. (2018) A Meta-Analysis of *GBA* -Related Clinical Symptoms in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis*, 2018: 1–7.
- (359) Cooper-Knock J, Frolov A, Highley JR, Charlesworth G, Kirby J, Milano A, Hartley J, Ince PG, McDermott CJ, Lashley T, Revesz T, Shaw PJ, Wood NW, Bandmann O. (2013) C9ORF72 expansions, parkinsonism, and Parkinson disease: a clinicopathologic study. *Neurology*, 81: 808–811.
- (360) Cavallieri F, Mandrioli J, Rosafio F, Contardi S, Fasano A, Menozzi E, Caponnetto C, Chiò A, Valzania F. (2017) C9ORF72 and parkinsonism: Weak link, innocent bystander, or central player in neurodegeneration? *J Neurol Sci*, 378: 49–51.
- (361) Ticozzi N, Tiloca C, Calini D, Gagliardi S, Altieri A, Colombrita C, Cereda C, Ratti A, Pezzoli G, Borroni B, Goldwurm S, Padovani A, Silani V. (2014) C9orf72 repeat expansions are restricted to the ALS-FTD spectrum. *Neurobiol Aging*, 35: 936.e13-936.e17.
- (362) Synofzik M, Asmus F, Reimold M, Schöls L, Berg D. (2010) Sustained dopaminergic response of parkinsonism and depression in POLG-associated parkinsonism. *Mov Disord*, 25: 243–245.
- (363) Wilcox RA, Churchyard A, Dahl HH, Hutchison WM, Kirby DM, Thyagarajan D. (2007) Levodopa response in Parkinsonism with multiple mitochondrial DNA deletions. *Mov Disord*, 22: 1020–1023.

10 Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Illés A, Balicza P, Gál A, Pentelényi K, Csabán D, Gézsi A, Molnár V, Molnár MJ. (2020) Az örökletes Parkinson-kór mint a POLG-gén károsodásának új klinikai megjelenési formája [Hereditary Parkinson's disease as a new clinical manifestation of the damaged POLG gene]. Orvosi Hetilap, 161.20: 821–828. IF: 0,564

Illés A, Csabán D, Grosz Z, Balicza P, Gézsi A, Molnár V, Bencsik R, Gál A, Klivényi P, Molnár MJ. (2019) The role of genetic testing in the clinical practice and research of early-onset Parkinsonian disorders in a Hungarian cohort: Increasing challenge in genetic counselling, improving chances in stratification for clinical trials. Frontiers in Genetics, 10:1061. IF: 3,517

Illés A, Balicza P, Molnár V, Bencsik R, Szilvási I, Molnár MJ. (2019) Dynamic interaction of genetic risk factors and cocaine abuse in the background of Parkinsonism—a case report. BMC neurology, 19.1:260. IF: 2,233

A disszertációhoz nem kapcsolódó publikációk

Fekete B, Pentelényi K, Rudas G, Gál A, Grosz Z, Illés A, Jimoh I, Csukly G, Domonkos A, Molnár MJ. (2019). Broadening the phenotype of the TWNK gene associated Perrault syndrome. BMC Medical Genetics, 20(1), 1-8. IF: 1,740

Melicher D, Illés A, Littvay L, Tárnoki ÁD, Tárnoki DL, Bikov A, Kunos L, Csabán D, Buzás EI, Molnár MJ, Falus A. (2019) Positive association and future perspectives of mitochondrial DNA copy number and telomere length – a pilot twin study. Archives of medical science, 15.1 IF: 2,380

Dóra Melicher and Anett Illés contributed equally to this work.

Balicza P, Grosz Z, Molnár V, Illés A, Csabán D, Gézsi A, Dézsi L, Zádori D, Vécsei L, Molnár MJ. (2018) NKX2-1 New Mutation Associated with Myoclonus, Dystonia, Pituitary Dysfunction and Empty Sella. Frontiers in genetics, 9:335. IF: 3,517

Kecskeméti N, Szönyi M, Gáborján A, Küstel M, Milley GM, Süveges A, Illés A, Kékési A, Tamás L, Molnár MJ, Szirmai Á, Gál A. (2018) Analysis of GJB2 mutations and the clinical manifestation in a large Hungarian cohort. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 275.10:2441-2448. IF: 1,750

Balicza P, Grosz Z, Bencsik R, Illés A, Gál A, Gézsi A, Molnár MJ. (2018) A teljesexom-szekvenálás jelentősége a ritka neurológiai betegségek diagnosztikájában – saját tapasztalatok egy ataxiás eset kapcsán [Significance of whole exome sequencing in the diagnostics of rare neurological diseases - own experiences through a case presenting with ataxia]. *Orvosi Hetilap*, 159.28:1163-1169. IF: 0,564

Varga NÁ, Pentelényi K, Balicza P, Gézsi A, Reményi V, Hársfalvi V, Bencsik R, Illés A, Prekop C, Molnár MJ. (2018) Mitochondrial dysfunction and autism: Comprehensive genetic analyses of children with autism and mtDNA deletion. *Behavioral and Brain Functions*, 14.1:4. IF: 2,457

Melicher D, Illés A, Pállinger É, Kovács ÁF, Littvay L, Tárnoki ÁD, Tárnoki DL, Bikov A, Molnár MJ, Buzás EI, Falus A. (2018) Tight co-twin similarity of monozygotic twins for hTERT protein level of T cell subsets, for telomere length and mitochondrial DNA copy number, but not for telomerase activity. *Cellular and molecular life sciences*, 75.13:2447-2456. IF: 7,014

11 Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek Prof. Dr. Molnár Mária Juditnak, hogy éveken át irányította és segítette kutatómunkámat a molekuláris genetika területén, valamint, hogy lehetővé tette sikeres doktori munkám feltételeit.

Szeretném megköszönni a sok segítséget és támogatást a Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegégek Intézet összes munkatársának, a biológus és laboros kollégáknak, az orvoskollégáknak, valamint az Intézet életét szervező valamennyi kollégának. Külön köszönet illeti Dr. Balicza Pétert a disszertáció-, illetve a publikációk megírásában nyújtott el nem fogyó segítségéért és ötleteiért. Köszönöm a laboratóriumi és bioinformatikai munkában nyújtott segítséget Molnár Viktornak, Dr. Pentelényi Klárának, Dr. Gézsi Andrásnak és Kovács Margitnak. Köszönöm dr. Grosz Zoltánnak, hogy klinikai tudásával segítette munkámat. Köszönettel tartozom valamennyi beteg referáló neurológus szakorvosnak, valamint a vizsgálatban résztvevő betegeknek és családjuknak.

Külön köszönöm Csabán Dórának, Bencsik Renátának és dr. Varga Noémi Ágnesnek az elmúlt öt évet, a sikereket és kudarokat, amiket együtt éltünk át és együtt mentünk előre tovább.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm Páromnak, hogy segített és mellettem állt a fokozatszerzés éveiben, hogy a jó és nehéz pillanatokban is számíthattam Rá. Hálás vagyok a szüleimnek és testvéremnek a megtartó szeretetükért és támogatásukért. Köszönöm barátaimnak és mentoraimnak el nem fogyó türelmüket és hasznos meglátásaikat.

Kutatásomhoz anyagi támogatást nyújtott a KTIA_13_NAP-A-III/6 Nemzeti Agykutatási Program és a Semmelweis Egyetem „Az orvos-, egészség tudományi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése” EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 számú pályázat.

12 Mellékletek

1. melléklet Sanger szekvenáláshoz használt forward és reverz primer szekvenciák

Gén	Exon	Irány	Szekvencia
<i>PRKN</i>	1	Forward	5' AGGCGTGAGGAGAACTACG 3'
		Reverz	5' CGCAGAGAGGCTGTACCTG 3'
	2	Forward	5' GAGGGGTAAATCGGTTGAGA 3'
		Reverz	5' GCAGTGTGGAGTAAAGTTCAA 3'
	3	Forward	5' TCTCGCATTTTCATGTTTGACA 3'
		Reverz	5' TAAATATGCACCCGGTGAGG 3'
	4	Forward	5' TTCAAATGTTCTGAAGACT 3'
		Reverz	5' TTTCTTTTCAAAGACGGGTGA 3'
	5	Forward	5' TCTGCAGACCACTTTGAA 3'
		Reverz	5' GAGGAATGAATGTGACCAGGT 3'
	6	Forward	5' TCACACCTCGTAACAGATTTCTTC 3'
		Reverz	5' GCTCGTGTGGCAGAACAATA 3'
	7	Forward	5' GCCTTCCCACTGACAGGTA 3'
		Reverz	5' AAATTCTTCTGCTAGGGTTTACG 3'
	8	Forward	5' GGCAACACTGGCAGTTGATA 3'
		Reverz	5' GGAGCCCAAAGTGTCTCATT 3'
	9	Forward	5' AAGCAAGAAATCCCATGCAC 3'
		Reverz	5' AAGTCCAAAGGGAAAATGAAA 3'
	10	Forward	5' TGAATTTGGAAAAGGAAAAAT 3'
		Reverz	5' GGAAGTCTCCATGACCTCCA 3'
	11	Forward	5' CCGACGTACAGGGAACATAAA 3'
		Reverz	5' ATTCTCCCCAAAGAGCACA 3'
	12	Forward	5' TCTAGGCTAGCGTGCTGGTT 3'
		Reverz	5' GCGTGTGTGTGTGTGTTTGA 3'
<i>PINK1</i>	1	Forward	5' GCCCAAGTTTGTGTTGTGAC 3'
		Reverz	5' GCGCTTAGCTCCGTCCTC 3'
	2	Forward	5' TCCCCTGTTTCCCTTTTCTT 3'
		Reverz	5' GGCACCTTTCCTGTGGATAA 3'
	3	Forward	5' GGTTACAGGCAGGGCTTACA 3'
		Reverz	5' CACTGTACCAGGTGCTGAGG 3'
	4	Forward	5' GTGTTGGTGTGGCCTTAGGT 3'
		Reverz	5' TGACCCTGTTCTCCAAAACC 3'
	5	Forward	5' CGTATTGGGAGTCGTCGATGT 3'
		Reverz	5' GACCTGAAGAGTCAGTCCTAAA 3'
	6	Forward	5' GTCAGCTATGTCTTGCTGGTG 3'
		Reverz	5' ATCACAAGGCATCGAGTCTCC 3'
	7	Forward	5' TGGATCAGGTGATGTGCAGGA 3'
		Reverz	5' AGGATCTGTCACTGTGGCTCT 3'

	8	Forward	5' GAGAAGGGAAGACCCTCACTA 3'
		Reverz	5' CAGACTGAACTCTCACTCAAGT 3'
<i>PARK7</i>	2	Forward	5' TTTGGGGTATCTCAGGGTTG 3'
		Reverz	5' CAAAATGATTTAAAAATCCAAAAAC 3'
	3	Forward	5' GGGTGAGACCCCATCTCTCT 3'
		Reverz	5' TTTTCTAAAATGAGTCTGTGCTAACAA 3'
	4	Forward	5' CAATTTAATGCACAGTTGAAATGAA 3'
		Reverz	5' CCCCAGCTTTATTGAGGTA 3'
	5	Forward	5' TCCTAGTGAGTGATTGGTTAGTGG 3'
		Reverz	5' AGATGCCCTGCATGCTTTAT 3'
	6	Forward	5' CCAGGCACTATTGCGATTTT 3'
		Reverz	5' AGATCACGCCACTGCACTC 3'
	7	Forward	5' CGTCTTTCTCGTCACATAGCC 3'
		Reverz	5' GCGAACACAGTGAGAATGGA 3'
<i>SNCA</i>	1-2	Forward	5' GAGAAGGAGGAGGACTAGGAGG 3'
		Reverz	5' CGGCGTTCTCAGGATTC 3'
	3	Forward	5' TGTGGGAACAAAGGGGATA 3'
		Reverz	5' GCTTATCAATTCAAAGCCCT 3'
	4	Forward	5' GGACATCTTGGTGGCTTTTG 3'
		Reverz	5' TTTGCATGGCATTATCTGG 3'
	5	Forward	5' GCTAATCAGCAATTTAAGGCTAG 3'
		Reverz	5' GATATGTTCTTAGATGCTCAG 3'
	6	Forward	5' CGGAGGCATTGTGGAGTTTAG 3'
		Reverz	5' CCACGTAATGAGCATGTAGAGAGC 3'
	7	Forward	5' GACTGGGCACATTGGAAGTGG 3'
		Reverz	5' GCTGTCAGTGCTGATGCGTAATTG 3'
<i>LRRK2</i>	19	Forward	5' GAAGTTTGATTTGCCAGTCTC 3'
		Reverz	5' TCAAAGTGGCATGAATAACCA 3'
	21	Forward	5' AAGTGAAAAACCAACATGGC 3'
		Reverz	5' ACATCAGGGAAATCCCTACC 3'
	23	Forward	5' AGCCTGATTGCTAGGAGGTG 3'
		Reverz	5' GGGGGACTTATCACCCAGTG 3'
	24	Forward	5' GCTAGACTTAAGTTCCTCAGA 3'
		Reverz	5' TCAGCATATTTAGGCAACCC 3'
	25	Forward	5' TCCTCTTTGATGCTGTTCTT 3'
		Reverz	5' TGCCACTTTTAAATCCACAA 3'
	27	Forward	5' GGTGGTTCAACTTCAGGCTC 3'
		Reverz	5' AATGGAAATTAATTAAGTG 3'
	31	Forward	5' AGCAGGCCAGTTTGAAAG 3'
		Reverz	5' GACATTTCTAGGCAGTTGAG 3'
	32	Forward	5' CTGAATTTGCCAACCATTG 3'
		Reverz	5' GAACCGTATGGATATTCTCTC 3'

33	Forward	5' AAAGCCCCTTGATATTTGTT 3'
	Reverz	5' ATGCTTTGACCATAACCCCC 3'
34	Forward	5' AGGAGGTTTACACTAGAAGCA 3'
	Reverz	5' AGGCCACATGGTTGCTAGAG 3'
35	Forward	5' AGGTTGGGTGTTTTGTGAGG 3'
	Reverz	5' ATGCCATCTCCCTAATTTCT 3'
40	Forward	5' CATGTTTCAGCCTGTTGATG 3'
	Reverz	5' GGCACAGTGTTACTGGGAA 3'
41	Forward	5' GCACAGAATTTTTGATGCTT 3'
	Reverz	5' GAGGTCAGTGGTTATCCAT 3'
48	Forward	5' TCAATTCAGAATGGTTAGGG 3'
	Reverz	5' GAAAAGATGGTGCTGAGAA 3'

2. melléklet A *C9orf72* gén vizsgálatához használt primerek szekvenciái

anchor primer	5' CAG GAA ACA GCT ATG ACG 3'
antisense primer	5' CAG GAA ACA GCT CTG ACC CCC CGG CCC CGG CCC CGG 3'
sense primer	5' FAM-CAA CCG CAG CCT GTAGCA AGC TCT GG 3'

3. melléklet A *C9orf72* vizsgálata során alkalmazott repeat-primed PCR program

98°C	5 perc	1x
98°C	30 másodperc	
70°C	1 perc	2x
72°C	2 perc	
98 °C	30 másodperc	
68°C	1 perc	3x
72°C	2 perc	
98°C	30 másodperc	
66°C	1 perc	4x
72°C	2 perc	
98°C	30 másodperc	
64°C	1 perc	5x
72°C	2 perc	
98°C	30 másodperc	
62°C	1 perc	6x
72°C	2 perc	
98°C	30 másodperc	
60°C	1 perc	7x
72°C	2 perc	
98°C	30 másodperc	
58°C	1 perc	8x
72°C	2 perc	
98°C	30 másodperc	

56°C	1 perc	35x
72°C	2 perc	
72°C	7 perc	1x
4°C	∞	

4. melléklet Az újgenerációs panel szekvenálás során vizsgált gének listája

Gén	Teljes név
<i>ABCA7</i>	ATP binding cassette subfamily A member 7
<i>ADAM10</i>	ADAM metallopeptidase domain 10
<i>ADORA1</i>	adenosine A1 receptor
<i>AKT1</i>	AKT serine/threonine kinase 1
<i>ALS2</i>	alsin Rho guanine nucleotide exchange factor ALS2
<i>ANG</i>	angiogenin
<i>APOE</i>	apolipoprotein E
<i>APP</i>	amyloid beta precursor protein
<i>ATM</i>	ATM serine/threonine kinase
<i>ATP13A2</i>	ATPase cation transporting 13A2
<i>ATP1A3</i>	ATPase Na ⁺ /K ⁺ transporting subunit alpha 3
<i>ATP6AP2</i>	ATPase H ⁺ transporting accessory protein 2
<i>ATXN2</i>	ataxin 2
<i>BACE1</i>	beta-secretase 1
<i>BIN1</i>	bridging integrator 1
<i>C19orf12</i>	chromosome 19 open reading frame 12
<i>C9orf72</i>	chromosome 9 open reading frame 72
<i>CD2AP</i>	CD2 associated protein
<i>CD33</i>	CD33 molecule
<i>CFL1</i>	cofilin 1
<i>CHCHD10</i>	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10
<i>CHCHD2</i>	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2
<i>CHMP2B</i>	charged multivesicular body protein 2B
<i>CLU</i>	clusterin
<i>CP</i>	ceruloplasmin
<i>CR1</i>	complement C3b/C4b receptor 1
<i>CTSD</i>	cathepsin D
<i>CSF1R</i>	colony stimulating factor 1 receptor
<i>CST3</i>	cystatin C
<i>DCAF17</i>	DDB1 and CUL4 associated factor 17
<i>DCC</i>	DCC netrin 1 receptor
<i>DCTN1</i>	dynactin subunit 1
<i>DNAJC13</i>	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13

<i>DNAJC5</i>	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C5
<i>DNAJC6</i>	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6
<i>DNMT1</i>	DNA methyltransferase 1
<i>EIF4G1</i>	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1
<i>ELAVL1</i>	ELAV like RNA binding protein 1
<i>EPHA1</i>	EPH receptor A1
<i>EPHA4</i>	EPH receptor A4
<i>ERBB4</i>	erb-b2 receptor tyrosine kinase 4
<i>FBXO7</i>	F-box protein 7
<i>FIG4</i>	FIG4 phosphoinositide 5-phosphatase
<i>FTL</i>	ferritin light chain
<i>FUS</i>	FUS RNA binding protein
<i>GBA</i>	glucosylceramidase beta
<i>GCH1</i>	GTP cyclohydrolase 1
<i>GIGYF2</i>	GRB10 interacting GYF protein 2
<i>GRN</i>	granulin precursor
<i>HNRNPA1</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
<i>HTRA2</i>	HtrA serine peptidase 2
<i>LRRK2</i>	leucine rich repeat kinase 2
<i>MAPT</i>	microtubule associated protein tau
<i>MARK2</i>	microtubule affinity regulating kinase 2
<i>MS4A4E</i>	membrane spanning 4-domains A4E
<i>MS4A6A</i>	membrane spanning 4-domains A6A
<i>NOTCH3</i>	notch receptor 3
<i>OPTN</i>	optineurin
<i>PANK2</i>	pantothenate kinase 2
<i>PARK2</i>	parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase
<i>PARK7</i>	Parkinsonism associated deglycase
<i>PICALM</i>	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
<i>PINK1</i>	PTEN induced kinase 1
<i>PLA2G6</i>	phospholipase A2 group VI
<i>POLG</i>	DNA polymerase gamma, catalytic subunit
<i>PRKRA</i>	protein activator of interferon induced protein kinase
<i>PRNP</i>	prion protein
<i>PSAP</i>	prosaposin
<i>PSEN1</i>	presenilin 1
<i>PSEN2</i>	presenilin 2
<i>PTK2B</i>	protein tyrosine kinase 2 beta
<i>RAD51</i>	RAD51 recombinase
<i>SLC30A10</i>	solute carrier family 30 member 10

<i>SLC6A3</i>	solute carrier family 6 member 3
<i>SNCA</i>	synuclein alpha
<i>SNCB</i>	synuclein beta
<i>SOD1</i>	superoxide dismutase 1
<i>SORL1</i>	sortilin related receptor 1
<i>SPG11</i>	SPG11 vesicle trafficking associated, spatascin
<i>SPR</i>	sepiapterin reductase
<i>SQSTM1</i>	sequestosome 1
<i>SYNJ1</i>	synaptojanin 1
<i>TAF1</i>	TATA-box binding protein associated factor 1
<i>TARDBP</i>	TAR DNA binding protein
<i>TBK1</i>	TANK binding kinase 1
<i>TBP</i>	TATA-box binding protein
<i>TH</i>	tyrosine hydroxylase
<i>TMEM106B</i>	transmembrane protein 106B
<i>TMEM230</i>	transmembrane protein 230
<i>TOMM40</i>	translocase of outer mitochondrial membrane 40
<i>TOR1A</i>	torsin family 1 member A
<i>TPP1</i>	tripeptidyl peptidase 1
<i>TREM2</i>	triggering receptor expressed on myeloid cells 2
<i>TYROBP</i>	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
<i>UBE3A</i>	ubiquitin protein ligase E3A
<i>UCHL1</i>	ubiquitin C-terminal hydrolase L1
<i>VAPB</i>	VAMP associated protein B and C
<i>VCP</i>	valosin containing protein
<i>VPS13C</i>	vacuolar protein sorting 13 homolog C
<i>VPS35</i>	VPS35 retromer complex component
<i>WDR45</i>	WD repeat domain 45

Az örökletes Parkinson-kór mint a *POLG*-gén károsodásának új klinikai megjelenési formája

Illés Anett ▪ Balicza Péter dr. ▪ Gál Anikó dr.
Pentelényi Klára dr. ▪ Csabán Dóra ▪ Gézsi András dr.
Molnár Viktor dr. ▪ Molnár Mária Judit dr.

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézete, Budapest

A nukleárisan kódolt *POLG*-gén fehérjeterméke kulcsszerepet játszik a mitokondriális DNS replikációjának fenntartásában, és hibája különböző súlyosságú, több szervrendszert érintő betegségeket okoz. A klinikai spektrum rendkívül tág, a leggyakrabban előforduló tünetek közé tartozik többek között a ptosis, a myoclonus, az epilepszia, a myopathia, a szenzoros ataxia, a parkinsonizmus, a kognitív hanyatlás és az infertilitás is. Ma már ismert, hogy a Parkinson-kór kialakulása során a mitokondriális diszfunkció is nagy jelentőséggel bír a substantia nigra dopaminerg sejtjeinek elhalásában. Ezért a *POLG*-génben bekövetkező változások befolyásolhatják a különböző örökletes neurodegeneratív betegségeknél, így a monogén parkinsonizmus kialakulását is. A Parkinson-kór és a *POLG* kapcsolatáról azonban még kevés az elérhető információ, és ez idáig a magyar populációra vonatkozó adatok sem álltak rendelkezésünkre. Vizsgálatunk során 67 magyar, a parkinsonizmus tüneteit mutató páciens esetében újgenerációs szekvenálást végeztünk, és a *POLG*-génben található, potenciálisan káros variánsokat elemeztük. 3 beteg esetében azonosítottunk potenciálisan kóros eltérést. Közleményünkkel arra szeretnénk felhívni a figyelmet, hogy a parkinsonizmus differenciáldiagnóza során az esetleges *POLG* genetikai érintettségét is figyelembe kell venni. Különösen olyan plusztünetek jelenlétekor, mint az ophthalmoparesis, a nem vascularis típusú fehérállományi laesiók, a pszichiátriai komorbiditás és a tünetek viszonylag korai indulása. Korábbi irodalmi adatok és saját tapasztalataink alapján összefoglaltuk a *POLG*-asszociált parkinsonizmus lehetséges diagnosztikai megközelítését is. *Orv Hetil.* 2020; 161(20): 821–828.

Kulcsszavak: *POLG*, parkinsonizmus, Parkinson-kór, újgenerációs szekvenálás

Hereditary Parkinson's disease as a new clinical manifestation of the damaged *POLG* gene

The protein product of the nuclear-encoded *POLG* gene plays a key role in the maintenance of mitochondrial DNA replication, and its failure causes multi-system diseases with varying severity. The clinical spectrum is extremely wide, and the most common symptoms include ptosis, myoclonus, epilepsy, myopathy, sensory ataxia, parkinsonism, cognitive decline and infertility. Now, it is known that mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease plays a key role in the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra. Therefore, changes in the *POLG* gene may influence the development of various hereditary neurodegenerative diseases, including monogenic parkinsonism. However, only limited information is available on the relationship between Parkinson's disease and *POLG* gene and until now, there are no available data about the Hungarian population. In our study, we performed a next-generation sequencing study of 67 Hungarian patients with parkinsonism and analyzed the potentially damaging alterations in the *POLG* gene. 3 patients have been identified with a potential pathogen variant. In this study, we would like to call attention to the fact that during the differential diagnosis of parkinsonism, the possible involvement of *POLG* gene should be kept in mind. Especially in the presence of additional symptoms, such as ophthalmoparesis, non-vascular white matter lesions, psychiatric comorbidity, and relatively early age of onset, the *POLG* gene should be taken into consideration. Based on previous data from the literature and our own experience, we have summarized a possible diagnostic approach for *POLG*-associated parkinsonism.

Keywords: *POLG*, parkinsonism, Parkinson's disease, new-generation sequencing

Illés A, Balicza P, Gál A, Pentelényi K, Csabán D, Gézsi A, Molnár V, Molnár MJ. [Hereditary Parkinson's disease as a new clinical manifestation of the damaged *POLG* gene]. *Orv Hetil.* 2020; 161(20): 821–828.

(Beérkezett: 2020. január 7.; elfogadva: 2020. január 27.)

Rövidítések

IKGP = (1000 Genomes Project) 1000 Genom Projekt; ACMG = (American College of Medical Genetics and Genomics) Amerikai Orvosi Genetika és Genomika Testület; ANS = ataxiás neuropathia szindróma; AS = (Alpers syndrome) Alpers-szindróma; ClinVar = (clinical interpretation of genetic variants) a genetikai variánsok klinikai értelmezése; DATscan = (dopamine transporter scan) dopamintranszporter-vizsgálat; dbNSFP = database for nonsynonymous SNPs' functional predictions; DBS = (deep brain stimulation) mély agyi stimuláció; DNS = dezoxiribonukleinsav; ESP = (Exome Sequencing Project) Exomszekvenálás Projekt; exo = exonukleáz domén; GATK = (genome analysis toolkit) genomelemző eszközkészlet; gnomAD = (Exome Aggregation Consortium Database and Genome Aggregation Database) genomaggregációs adatbázis; LCIG = (levodopa-carbidopa intestinal gel) levodopa/karbidopa intestinalis gél; link = linker régió; MAF = minorallél-frekvencia; MD = (mitochondrial disorders) mitokondriális rendellenességek; MDS = (Movement Disorder Society) Nemzetközi Mozgászavar Társaság; MR = mágneses rezonancia; mtDNS = mitokondriális DNS; NEPSYBANK = (Neurological-Psychiatric Biobank) Neurológiai-Pszichiátriai Biobank; NGS = (next-generation sequencing) újgenerációs szekvenálás; *PARK7* = Parkinsonism-associated deglycase, protein deglycase DJ-1; PD = (Parkinson's disease) Parkinson-kór; PEO = (progressive external ophthalmoplegia) progresszív externális ophthalmoplegia; *PINK1* = PTEN-induced kinase-1; pol = polimeráz domén; *POLG* = mitokondriális DNS-polimeráz- γ katalitikus alegység; *PRKN* = parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase; VCF = (variant call format) variánskivonatoló formátum

A mitokondriális DNS-polimeráz- γ (polg) egy olyan fehérje, mely a mitokondriális DNS (mtDNS) replikációjáért felel. Mivel minden sejtben több száz mitokondrium van, fontos, hogy a replikáció hibátlan legyen. A *POLG*-fehérje hibáiból fakadóan másodlagos mtDNS-mutációk (deletiók, duplicációk, depleciók, esetleg pontmutációk) jelenhetnek meg [1]. A mtDNS-ben bekövetkező deletiók és pontmutációk, illetve a mtDNS depleciója különböző súlyosságú mitokondriális betegségekkel mutatnak összefüggést, de az öregedés során is megfigyelhetők [2]. A *POLG*- (DNS-polimeráz- γ katalitikus alegység) génnek három doménje van: 1. exonukleáz domén (exo), 2. linker régió (link), 3. polimeráz domén (pol) [3]. Jelenlegi ismereteink alapján körülbelül 300 olyan eltérést azonosítottak a génben, amelyek különböző betegségekhez kapcsolhatók (Human DNA Polymerase Gamma Mutation Database) [4]. A *POLG*-gén hibájához társított betegségek közé tartozik többek között a progresszív externális ophthalmoplegia (PEO), az Alpers-szindróma (AS), az ataxiás neuropathia szindróma (ANS) és a myocerebrohepatopathia spektrum betegség. A klinikai spektrum nagyon széles, a leggyakrabban társított tünetek közül a myoclonus, az epilepszia, a myopathia, a szenzoros ataxia, a kognitív hanyatlás és az infertilitás emelendő ki [4]. Ezzel szemben a Parkinson-kór és a *POLG* társulásáról ritkábban olvashatunk.

A Parkinson-kór kialakulása során az oxidatív stressz, a mitokondriális diszfunkció és a fehérjeaggregáció is

szerepet játszik a dopaminerg neuronok pusztulásában a substantia nigra területén [5]. Ezt támasztja alá az is, hogy a parkinsonizmust okozó leggyakoribb gének közül a *PRKN*-, a *PINK1*- és a *PARK7*-gén mutációi is rendelkeznek a mitokondriumhoz kapcsolódó funkcióval [6]. A mitokondriális légzési lánc kémiai gátlása a dopaminerg neuronok pusztulásához és így parkinsonizmus kialakulásához vezet [7]. A dopaminerg neuronokban kimutathatóan magasabb a mitokondriális DNS mutációs rátája [8]. Mivel ez utóbbit a *POLG*-fehérje hibás működése is okozhatja, a *POLG*-génben bekövetkező változások fontos szerepet játszhatnak a különböző örökletes neurodegeneratív betegségek, így a monogénes parkinsonizmus kialakulásában is. *Luoma és mtsai* már 2004-ben hét családban igazolták feltételezésüket, miszerint a *POLG*-fehérje pol doménjét érintő mutációk bizonyos esetekben specifikusan parkinsonizmusként manifesztálódhatnak [1]. A dopaminerg neuronokban a pol doménben bekövetkező mutációk elsősorban az oxidatív stressz hatásának fokozásán keresztül vezethetnek parkinsonizmus kialakulásához, de ismertek olyan patogén eltérések is, melyek a gén más régióját érintik [3, 9]. Számos, képzakotással foglalkozó tanulmány szerint a *POLG*-eltéréssel rendelkező betegeknél a substantia nigrában súlyos és progresszív dopaminergneuron-pusztulás detektálható [1, 3, 10, 11]. Az újgenerációs szekvenálás térhódításával a heterogén genetikai háttérrel rendelkező betegségek vizsgálata során lehetőség van egyszerre sok gén analízisére, ami felgyorsíthatja a diagnosztikai utat, így a beteg is hamarabb juthat hozzá a számára legmegfelelőbb terápiához [12, 13].

A legtöbb esetben az azonosított *POLG*-mutációk összetett heterozigóta vagy homozigóta misszensz szubsztitúciók, melyek közül egyesek már heterozigóta formában is összefüggésbe hozhatók bizonyos neurodegeneratív betegségekkel, mint például a PEO, az AS és a mitokondriális recesszív ataxia szindróma. *Murgai és mtsai* szerint a heterozigóta mutációk szubklinikus vagy enyhébb fenotípussal és későbbi indulással manifesztálódhatnak [14]. Számos, korábban leírt *POLG*-variáns homozigóta, összetett heterozigóta és heterozigóta formában is leírtak olyan betegekben, akik a parkinsonizmus tüneteit mutatták akár PEO-val, akár a nélkül (P587L, R722H, G737R, W748S, Y831C, R853W, E856K, R993C, E1143G, S1230F, Q1236H) [3].

Célkitűzés

Kutatásunk célja a monogénes parkinsonizmus és a *POLG*-gén kapcsolatának vizsgálata volt a magyar populációban. Vizsgálataink során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a parkinsonizmusban szenvedő betegek esetében milyen előfordulási gyakoriság jellemzi a *POLG*-gén mutációit. Korábbi irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy az érintett betegek körében azonosítható patogén kóroki eltérés [15].

Módszer

A tanulmányozott kohorsz

A vizsgált kohorszba 67 magyar páciens-t vontunk be, akik a Movement Disorder Society (MDS) kritérium-rendszere alapján a parkinsonizmus tüneteit mutatták (bradykinesia együttesen vagy tremorral, vagy rigiditással, vagy mindkettővel) [16]. A diagnózist minden esetben neurológus szakorvosok állították fel. Elsősorban olyan betegek genetikai vizsgálatára összpontosítottunk, akiknél nagyobb volt a valószínűsége a monogénes hátternek. Ezért a pozitív családi anamnézissel rendelkező betegek mellé ($n = 37$) korai indulású sporadikus ($n = 30$) betegeket válogattunk a kohorszba. A tünetek megjelenésének átlagos ideje $40,7 \pm 12,35$ év volt. A kontrollcsoportot nem rokon, egészséges alanyok alkották ($n = 55$, a tünetek megjelenésének átlagos ideje: $59,7 \pm 17,80$ év). A másodlagosan kialakult parkinsonizmust (vascularis, gyógyszer indukálta stb.) kizártuk vizsgálati csoportunkból.

A betegek és a kontrollszemélyek a Semmelweis Egyetem Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézetének NEPSYBANK biobankjából kerültek kiválogatásra [17]. Az írásos beleegyező nyilatkozatok a helsinki egyezmény értelmében aláírásra kerültek a betegek és a kontrollok esetében is, a vérvétel és a molekuláris genetikai analízis elvégzése előtt. A tanulmányt a Tudományos és Kutatásügyi Bizottság is elfogadta. A molekuláris genetikai analízis minden páciens esetében diagnosztikai célzattal készült el.

Molekuláris genetikai elemzés

A DNS-izolálás QIAamp DNA Blood Mini Kit segítségével történt a gyártói protokoll szerint (QIAGEN, Hilden, Germany). A vizsgálatba bevont 67 beteg közül teljesexom-analízis készült 16 esetben, célzott újgenerációs szekvenálás 51 esetben. Ez utóbbi esetben a neurodegeneratív betegségek hátterében a leggyakrabban érintett géneket szekvenáltuk. A genomiális DNS-könyvtárak készítéséhez Agilent SureSelectQXT Human All Exon v5 és SureSelectQXT Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing reagenseket használtunk a gyártói protokoll szerint (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Amerikai Egyesült Államok [USA]). A könyvtárkészítést követően az újgenerációs szekvenáláshoz az alábbi vegyszereket használtuk: Illumina HiSeq PE Cluster Kit v4-et a klasztergeneráláshoz cBot készüléken, HiSeq SBS Kit v4-et a szekvenáláshoz HiSeq2500 készüléken és MiSeq Reagent Kit v2-t (300-cycles) a szekvenáláshoz MiSeq készüléken (Illumina, San Diego, CA, USA).

Bioinformatikai elemzés

Az NGS-adatokból történő variánshívás GATK HaplotypeCaller (version 3.3-0) szoftverrel történt, a GATK

Best Practices iránymutatásai szerint [18]. Az ún. Variant Call Format (VCF-) fájlok az SnpEff szoftverrel [19], a ClinVar [20] és a dbNSFP [21] adatbázisok alapján kerültek annotálásra. A variánsok szűrése a szekvenálási adatokból a Budapesti Műszaki Egyetemen fejlesztett VariantAnalyzer szoftverrel történt. Az újonnan leírt variánsok klasszifikációja az American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) iránymutatásai szerint zajlottak [22, 23]. A variánsok minorallél-frekvenciáját (MAF) is figyelembe vettük, a ritka variánsokat az 1%-nál kisebb MAF mentén definiáltuk. A MAF értékét az alábbi adatbázisok felhasználásával becsültük meg: 1000 Genomes Project (1KGP), Exome Sequencing Project (ESP) és Exome Aggregation Consortium Database and Genome Aggregation Database (gnomAD v2.1), referenciaként a non-neuro (non-Finnish) populációt felhasználva.

Az analízis során a következő lépés az ismert betegséggel kapcsolt variánsok, valamint a fehérje funkciójára káros predikciós pontokkal rendelkező nem szinonim variánsok kiválasztása volt. A funkcióvesztéssel járó variánsokat (nonszensz, stop vesztés/nyerés, leolvasási kereteltolódás, kanonikus splice) és a misszensz eltéréseket, amelyeket párhuzamosan több predikciós algoritmus is károsnak jósolt, megőriztük a további elemzésre. Azokat a variánsokat, amelyek megfeleltek ezeknek a kritériumoknak, valamint hiányoztak a kontrollcsoportból, károsító mutációként jelöltük meg, és Sanger-szekvenálással validáltuk. Azokban az esetekben, amikor lehetőségünk volt rá, a családtagokat is megvizsgáltuk a detektált variánssra.

Eredmények

A *POLG*-gén teljes kódolórégióját 67, a parkinsonizmus tüneteivel kezelt beteg esetében elemeztük. Az analízis során 6, aminosavcserével járó eltérést azonosítottunk. A 6 különböző eltérés közül kettőt korábban polimorfizmusként írtak le (E1143G és Q1236H) [24, 25]. Az E1143G-aminosavcserével járó szubsztitúciót 5 betegben és 8 kontrollban, míg a Q1236H-variánst 16 betegben és 6 kontrollban azonosítottuk. A későbbiekben bemutatásra kerülő további 4 eltérést az 1. táblázatban foglaljuk össze. A korábbi irodalmi adatok alapján potenciálisan kóros eltérést találtunk két további betegben: a T251I + P587L összetett heterozigóta eltérést az 1. esetben, és a G737R-variánst a 3. esetben. Továbbá egy eddig még nem leírt aminosavcserét (H613D) azonosítottunk a 2. esetben.

Első eset

Az 57 éves férfi páciens betegsége 41 éves kora körül a bal kéz ügyetlenségével, merevségével kezdődött, később a bal lábát is nehezebben mozgatta. Vizsgálatokor aszimmetrikus kevert tónuszavart (rigor és spasticitas) és dysdiadochokinesist találtunk, tremor nem volt jelen.

1. táblázat | A *POLG* génben azonosított valószínűleg patogén, illetve bizonytalan jelentőségű misszensz variánsok

Variáns	Rs-azonosító	Fehérje domén	Zigotizás	Klinikai jelentőség	ACMG-klasszifikáció	MAF	Betegek	Kontrollok	Ref.
T251I/c.752C>T	rs113994094	exo	összetett het	P	LP	<0,01	P1	0	[4, 24]
P587L/c.1760C>T	rs113994096	linker		P	LP	<0,01	P1	0	
H613D/c.1837C>G	–	linker	het	VUS	LP	<0,01	P2	0	*
G737R/c.2209G>C	rs121918054	linker	het	P(AR)	LP	<0,01	P3	0	[25, 26]

*Ebben a tanulmányban került elsőként leírásra.

exo = exonukleáz domén; het = heterozigóta; LP = valószínűleg patogén; MAF = minorallél frekvencia; P = patogén; US = bizonytalan jelentőségű eltérés;

A koponya-MR nem talált eltérést. A DATscan-vizsgálat csökkent dopamintranszporter-szintet jelzett mindkét oldalon a putamenben és a nucleus caudatusban, jobb oldali túlsúllyal. A betegség előrehaladtával motoros és nem motoros fluktuáció jelentkezett, az OFF fázisokban a törzs izmaiban és a végtagokban fájdalmas dystoniával. Emellett pszichés tünetek, dysthymia és anxietais is megjelentek. A nem motoros tünetek közül obstipatio, alvászavar és krónikusfájdalom-szindróma volt jelen. Szemmozgászavart nem láttunk, de a beteg időszakos diplopriáról számolt be. A későbbiekben súlyosbodó dysarthria, vegetatív zavarok és dopamindiszregulációs szindróma is megjelent. A súlyos motoros fluktuáció miatt DBS-beültetésre került sor. Kognitív hanyatlás nem igazolódott, a beteg dysthymiás.

A családi anamnézisben apai ágon depresszió és suicidum szerepel. A genetikai analízis során a *POLG*-gén T251I és a P287L összetett heterozigóta eltérését azonosítottuk. Szegregációs elemzést nem állt módunkban végezni, de az irodalmi adatok alapján a két eltérés valószínűleg egy allélon van, ugyanis *Aitken és mtsai* egy 58 éves nő betegéről számoltak be, aki azonos mutációkkal rendelkezett, és klinikailag homályos látás, mindkét oldali ptosis, diplopia, nyugtalanláb-szindróma és végtagyengesség jellemezte [26].

Második eset

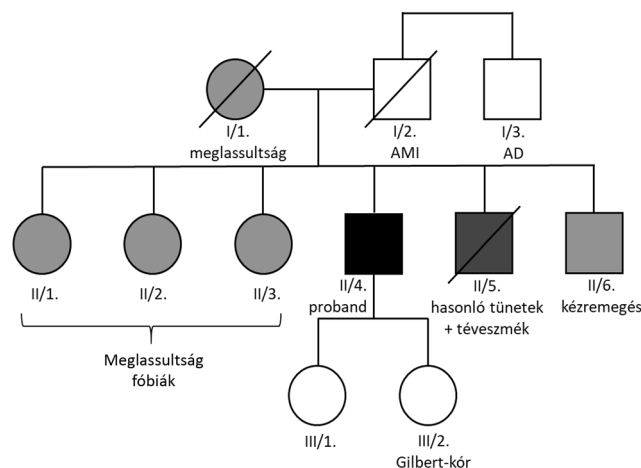
A 72 éves férfi betegsége 59 évesen, akinetikus-rigid tünetekkel és dominánsan járászavarral indult. A betegség lassan progrediált. Már a korai szakaszától jellemző volt az orthostaticus hypotensio. A koponya-MR nem vascularis jellegű fehérállományi jelzavart talált. A parkinsonizmus jelei mellett balra tekintéskor enyhe tekintésirányú nystagmust, valamint enyhe cervicalis dystoniát azonosítottunk.

Családi anamnéziséből kiemelendő, hogy egyik bátyjának is hasonló tünetei voltak, valamint súlyos téveszmékkel is küzdött (70 éves korában exitált). A probandnál 10 évvel idősebb másik bátyját tremor miatt vizsgálták. További három lánytestvérénél meglassultság és főbiás tünetek emelendő ki. A proband édesapja 63 éves korában exitált akut myocardialis infarctus követ-

kezében, az apja testvére Alzheimer-kóros volt. A proband édesanyja szintén meglassult volt, de nagyobb betegségről nem tudnak, 93 éves korában exitált. A proband egyik lányának Gilbert-kórja van (1. ábra). A genetikai vizsgálat a H613D/c.1837C>G eltérést azonosította, mely az irodalomban eddig még nem került leírásra, és a gnomAD adatbázisban sincs jelen; a predikciós pontszámok és az ACMG-besorolás szerint valószínűsíthetően patogén eltérés.

Harmadik eset

A 69 éves férfi páciensnek 58 éves korában kezdődött a betegsége akinetikus-rigid tünetekkel. A beteget 54 éves kora óta depresszióval kezelték, 64 éves korában paranoiditás, élénk álmok és pánikrohamok jelentkeztek. Később kognitív hanyatlás indult. 60 éves kora körül jelentős szubjektív panaszokat okozó sensoros neuropathia



1. ábra

A 2. esetet bemutató családfa

Az általunk azonosított mutációt a II/4. beteg hordozza. A II/5. testvérnek hasonló tünetei és súlyos téveszméi voltak. A II/6. testvérnek kézremegése van. A II/1., 2., 3. testvéreknél meglassultság és főbiás mechanizmusok jelentkeztek. Az I/2. édesapa AMI következtében exitált, az I/3. apai nagybátyja Alzheimer-kóros, és az I/1. édesanya meglassult volt. A III/2. gyermeknek Gilbert-kórja van

AMI = akut myocardialis infarctus; AD = Alzheimer-kór

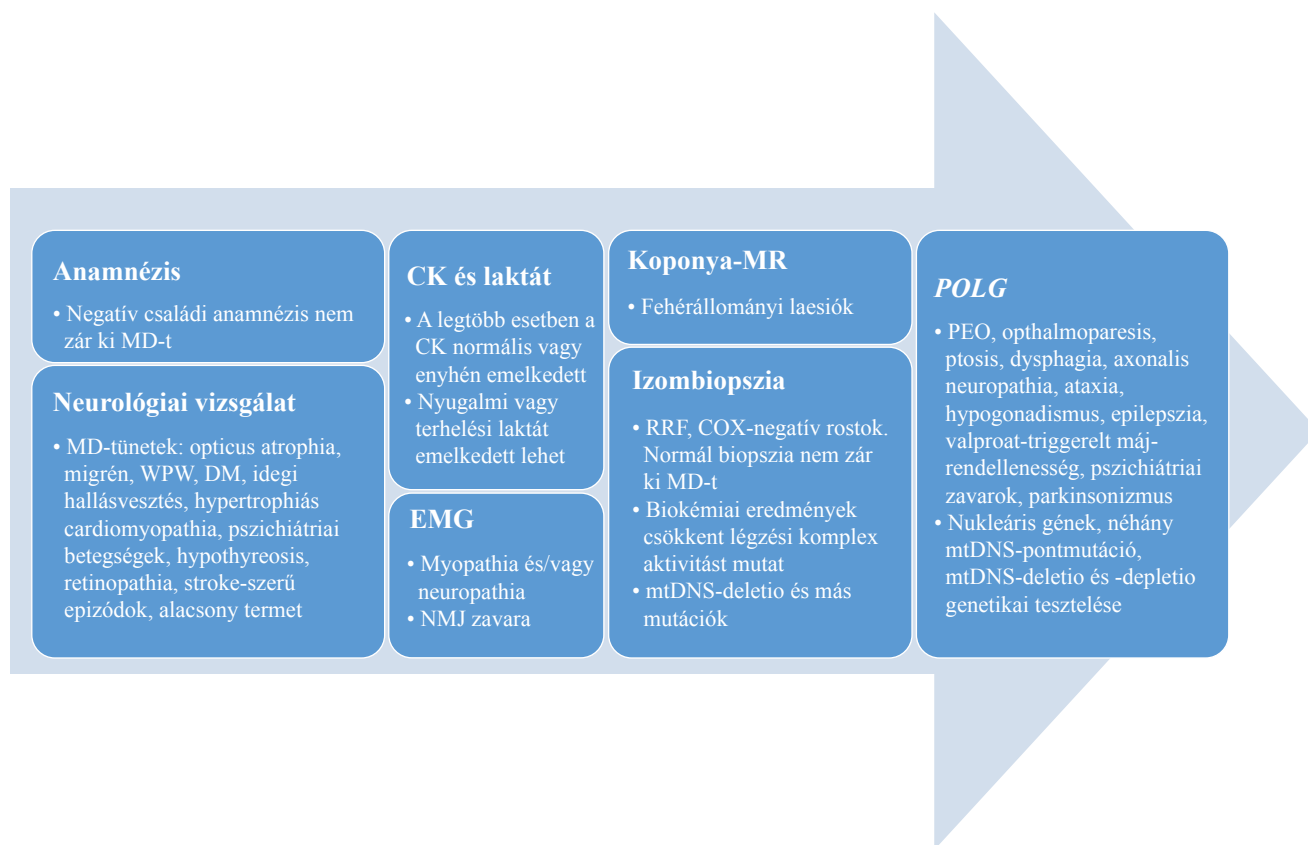
jelentkezett. A beteg 62 éves korában a proximális izmok gyengesége miatt elektrofiziológiai vizsgálat történt, mely a neuromuscularis junctio jelátviteli zavarát feltételezte, amely miatt piridosztigmin szedését javasolták. A koponya-MR-en mérsékelt cerebrális és cerebellaris atrophia és bizonytalan jelentőségű fehérállományi laesiók is ábrázolódtak. A DATscan egyértelmű dopaminerg károsodást igazolt. Kezdetben jól reagált a levodopakezelésre, de néhány év múlva motoros fluktuáció alakult ki, és a levodopaigény is jelentősen megnőtt. Később súlyos motoros fluktuáció, az OFF fázisban dystonia és neuropathiás fájdalom jelentkezett. A fentiek miatt LCIG- (levodopa/karbidopa intestinalis gél) kezelést kezdtek. Jelenleg a betegség előrehaladott stádiumban van, gyakori a lefagyás, a tartási instabilitás és a súlyos dysarthria.

A családi anamnéziséből kiemelendő, hogy mind anyai, mind apai ágon hasonló tünetek ismertek (édesanyja, anyai nagyanyja és édesapja is hasonló tünetekkel, többek között kézremegéssel küzdött). A detektált G737R-aminosavcserét eddig egy esetben írták le összetett heterozigóta formában, korai kezdetű parkinsonizmussal asszociálva [27].

Megbeszélés

A *POLG* diszfunkciója nagyon széles fenotípuspektrumot idézhet elő. Egyrésztől súlyos, progresszív, multisztémás betegséget okozhat, mint például az Alperszindróma. Más esetekben izolált progresszív ophthalmoplegia alakul ki, de nem ritkák a pszichiátriai betegségek sem. Ezekben a klasszikus *POLG* asszociált mendeli betegségekben sokszor autoszomális recesszív öröklésmentet írtak le, de olvashatunk autoszomális domináns öröklésmentről is [28]. Elképzelhető, hogy a heterozigóta *POLG*-mutáció nem klasszikus mitokondriális betegségeket okoz, hanem enyhébb, később manifesztálódó kórképek alakulnak ki, mint például a parkinsonizmus vagy a korai menopauza [1].

A sporadikus és idiopathiás Parkinson-kór patogenezisének hátterében már régóta ismert a mitokondriális diszfunkció szerepe [29]. Bizonyos esetekben a mtDNS elsődleges genetikai hibája, míg jóval gyakoribb esetben a *POLG*-gén mutációjának következményeként másodlagosan keletkezett átrendeződések direkt módon okozhatnak parkinsonizmust [29]. Parkinson-kórban szenvedő



2. ábra

A *POLG*-asszociált parkinsonizmus diagnosztikai megközelítése

A mitokondriális rendellenességek (MD) diagnosztikai megközelítése parkinsonizmusban szenvedő betegekben. Ezt az ábrát folyamatábrának tekintjük, de a valódi diagnosztikai folyamat a beteg konkrét klinikai megjelenésétől függ, és nem egy mereven definiált folyamat. A *POLG*-val kapcsolatos rendellenességek esetében piros zászló lehet a Parkinson-kórban szenvedő betegek/családok esetében, ha a fent felsorolt tünetek közül is azonosítható valamelyik [29]

COX = citokró-m-c-oxidáz; DM = diabetes mellitus; EMG = elektromiográfia; mtDNS = mitokondriális DNS; NMJ = neuromuscularis junctio; RRF = ragged red fiber; WPW = Wolff-Parkinson-White-szindróma

dő pácienseknél ritkán előfordulhatnak olyan tünetek, amelyek *POLG*-asszociált mitokondriális betegségre utalhatnak, mint például a ptosis, a myopathia és a neuropathia [29]. Ugyanakkor *Davidzon és mtsai* olyan korai indulású parkinsonizmus hátterében azonosítottak kóroki variánsokat, amelyeknél a tünetek között nem volt jelen PEO [27]. Kérdés továbbá, hogy a heterozigóta *POLG*-gén mutációja major vagy minor hatású a parkinsonizmus patogenezisében. *Murgai és mtsai* szerint a heterozigóta mutációk szubklinikai vagy enyhébb fenotípussal és későbbi indulással manifesztálódhatnak, feltételezhetően a különböző epigenetikai mechanizmusok következtében [14].

A mitokondriális parkinsonizmusnak, jelenlegi tudásunk szerint, nincs egyértelmű megkülönböztető jele, amely lehetővé tenné az azonnali diagnózist. Továbbá a negatív családi anamnézist sem tekinthetjük kizáró kritériumnak [29]. Az egyes jellemzők azonban segítséget nyújthatnak. A *POLG*-asszociált parkinsonizmusról általánosságban elmondható, hogy a tünetek 50 éves kor körül jelennek meg, csökken a dopaminfelvétel a striatumban, és általában jól reagálnak levodopára vagy dopaminagonistákra [30]; ez a mi betegeink esetében is igaz volt. Ezenkívül sok esetben a levodopa indukálta dyskinesia és a motoros fluktuáció is jellemző, amelyek szintén azonosíthatók voltak betegeinkben is [31]. A szemmozgás zavara, a koponya-MR, a pszichiátriai komorbiditás, a neuromuscularis junctio zavara, a neuropathia és a fehérállományi laesio is felvetheti a *POLG* szerepét a betegség patomechanizmusában. A parkinsonizmus és a *POLG*-mutációk együttes jelenléte az általunk vizsgált betegekben arra utalhat, hogy a *POLG* hibája a parkinsonizmus monogénes oka is lehet egyes esetekben. Ennek az összefüggésnek a hangsúlyozása klinikai szempontból is jelentőséggel bírhat. Amennyiben felvetődik a genetikai érintettség lehetősége a parkinsonizmus tüneteit mutató betegnél, a *POLG*-gén szekvenálását is meg kell fontolni. A *POLG*-asszociált parkinsonizmus esetében az izomgyengeséggel járó PEO, a neuromuscularis junctio zavara és a neuropathia a parkinsonizmus tüneteivel keverten jelentkezhet, amelyek a beteg gyógyszeres kezelésének módosítását tehetik szükségessé. A *POLG*-gén mutációjával érintett mitokondriális betegek esetében jelen pillanatban a mitokondriális koktél a bevált terápia, mely a mitokondriális oxidatív foszforilációt támogató koenzim-Q10-ből, a DNS-replikációt és -transzlációt támogató folsavból, valamint szabadgyök-fogókból áll, mint például a nagy dóziszú C-vitamin. Ezt egészíti ki a mitokondriális biogenezist fokozó, aerob jellegű tréning. A jelenleg fejlesztés alatt álló, a mitokondriális funkció javítását célzó készítmények is nagy valószínűséggel hatásosak lesznek ebben a betegcsoportban. A 2. ábrán a *POLG*-asszociált parkinsonizmus lehetséges diagnosztikai megközelítését foglaltuk össze.

A 67, parkinsonizmusban szenvedő beteg vizsgálata során három, familiáris esetben azonosítottunk potenciális kóroki variánst a *POLG*-gén esetében (8,11% a fami-

liáris esetekben és 4,48% a teljes vizsgált kohorszban). Itt fontos megjegyezni, hogy az erősen szelektált kohorsz miatt ez az előfordulási gyakoriság a teljes PD-vel érintett populációban jelentősen eltérhet, ami nehezíti az összehasonlítást más populációkban tapasztalt gyakorisági mutatókkal. Emiatt különösen fontos a *POLG*-gén további vizsgálata egy nagyobb magyar kohorszban is. Mindazonáltal már ebből a korlátozott esetszámú tanulmányból látható, hogy a *POLG*-mutáció gyakorisága a parkinsonizmusban szenvedő páciensek körében összehasonlítható az egyéb, Parkinson-kórral asszociált gének mutációs gyakoriságával [32, 33]. Ezt különösen azért fontos hangsúlyozni, mert egyre nagyobb figyelem irányul a primer mitokondriális génhibából fakadó Parkinson-kórra (*PRKN/PINK1/PARK7*). Ennek ellenére a többarcú mitokondriális diszfunkciót okozó *POLG*-gén mutációja csak ritkán merül fel a parkinsonizmus hátterében.

Az azonosított variánsok közül a T251I/P587L mutáció a negyedik leggyakoribb humán *POLG*-eltérés [34]. Habár a biokémiai vizsgálatok igazolták, hogy a P587L-variáns károsabban hat a fehérje szerkezetére, a T251I ezt szinergisztikusan befolyásolja, súlyosan károsítva a katalitikus aktivitást [4]. *Scuderi és mtsai* 2015-ben részletes listát tettek közzé a klinikai fenotípusról és a genetikai eltérésekről, amelyekben korábban a T251I/P587L aminosavcserék együttes jelenlétét is detektálták [35]. A fő klinikai képet a PEO uralja, ptosisal vagy a nélkül, és a másodlagos klinikai tünetek közé tartozik az ataxia, a myopathia, az epilepszia, a neuropathia, a májbetegségek és a parkinsonizmus. A tünetek megjelenésének ideje is nagyon változatos, és nem figyeltek meg a nemmel összefüggő mintázatot sem. A T251I-eltérés az exonukleáz, a P587L-eltérés pedig a linker régióban található [4]. Több korábbi esetben felmerült ennek az összetett heterozigóta mutációnak az autoszomális domináns jellege [26, 36–38]. A 2. esetben leírt H613D/c.1837C>G eltérés az irodalomban eddig még nem került leírásra, és a gnomAD adatbázisban sincs jelen. A variánst 8 predikciós algoritmus is károsnak ítélte, és az ACMG-klasszifikáció alapján valószínűsíthetően patogén besorolást kapott. Az azonos pozícióban korábban leírt H613Y-aminosavcserét heterozigóta formában azonosították egy férfi betegben, akinek a főbb tünetei a ptosis, a myopathia, a súlyos cerebellaris atrophia, a dysarthria és az enyhe kognitív hanyatlás volt [39]. A 3. esetben detektált G737R-aminosavcserét eddig egy esetben írták le összetett heterozigóta formában korai kezdetű parkinsonizmussal asszociálva [27]. Ezenkívül leírásra került korai kezdetű axonális Charcot–Marie–Tooth-betegséggel [40], epilepsiával és májelégtelenséggel [41] összetett heterozigóta formában. Megjegyzendő, hogy az eddig közölt esetekben jóval korábbi indulású volt a betegség, mint a mi páciensünk esetében. A korábbi irodalmi adatok és a magyar populációban kapott eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a parkinsonizmus differenciáldiagnózisa során az esetleges *POLG*

genetikai érintettségét figyelembe kell venni. Különösen olyan plusztünetek jelenlétekor, mint az ophthalmoparesis, a nem vascularis típusú fehérállományi laesiók, a pszichiátriai komorbiditás és a korai betegségkezdés.

Továbbá fontos figyelembe venni azt a lehetőséget is, hogy a többszörös *POLG*-mutáción kívül egyéb tényezők is hozzájárulhatnak a klinikai kép manifesztálódásához, a betegség súlyosságát és a tünetek megjelenésének idejét befolyásolva. Ilyen befolyásoló tényezők lehetnek egyéb nukleáris mitokondriális génekben bekövetkező mutációk, a megváltozó interakciók más mtDNS-replikációban szerepet játszó fehérjékkel, a mtDNS-heteroplazmia, az epigenetikai faktorok és a gén-környezet interakciók is.

Anyagi támogatás: A közlemény megírását a Nemzeti Kutatási Program KTIA_NAP_2017-1.2.1-NKP-2017-00002. számú pályázata és a Semmelweis Egyetem „Az orvos-, egészségtudományi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése” EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009. számú pályázata támogatta.

Szerzői munkamegosztás: I. A.: A genetikai vizsgálatok laboratóriumi elvégzése, az exomszekvenálási adatok értékelése, irodalomkutatás, a közlemény megírása. B. P.: Betegvizsgálat, a kézirat kritikus átolvasása. Gál A., P. K.: A kézirat kritikus átolvasása. Cs. D.: A genetikai vizsgálatok elvégzése, a kézirat kritikus átolvasása. Gézsi A., M. V.: Az exomszekvenálási adatok értékelése. M. M. J.: Betegvizsgálat, a közlemény megírása, irodalomkutatás, a kézirat kritikus átolvasása. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekeltségek: A szerzőknek nincsenek érdekelségeik.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozunk valamennyi neurológuskollégának, akik beteget delegáltak a vizsgálatba: *Bereznai Benjámin* (Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézete, Semmelweis Egyetem, Budapest), *Kovács Tibor*, *Takáts Annamária* és *Tamás Gertrúd* (Semmelweis Egyetem, Neurológiai Klinika, Budapest), *Hidasi Eszter* (Debreceni Egyetem, Neurológiai Klinika, Debrecen), *Diószeghy Péter* (Jósa András Oktatókórház, Nyíregyháza), *Klivényi Péter* (Szegedi Tudományegyetem, Neurológiai Klinika, Szeged). Továbbá köszönettel tartozunk az esetközlésben szereplő betegeknek és családjaiknak a vizsgálatban történő részvételért. A Genomikai Medicina és Ritka Betegségek Intézete az ERN-RND hálózat tagja.

Irodalom

- [1] Luoma P, Melberg A, Rinne JO, et al. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase γ mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* 2004; 364: 875–882.
- [2] Reeve AK, Krishnan KJ, Elson JL, et al. Nature of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons. *Am J Hum Genet*. 2008; 82: 228–235.

- [3] Hsieh PC, Wang CC, Tsai CL, et al. *POLG* R964C and *GBA* L444P mutations in familial Parkinson's disease: case report and literature review. *Brain Behav*. 2019; 9: e01281.
- [4] DeBalsi KL, Longley MJ, Hoff KE, et al. Synergistic effects of the in *cis* T251I and P587L mitochondrial DNA polymerase γ disease mutations. *J Biol Chem*. 2017; 292: 4198–4209.
- [5] Chen C, Turnbull DM, Reeve AK. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease – cause or consequence? *Biology (Basel)* 2019; 8: 38.
- [6] Tan SH, Karri V, Tay NW, et al. Emerging pathways to neurodegeneration: dissecting the critical molecular mechanisms in Alzheimer's disease, Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother*. 2019; 111: 765–777.
- [7] Luoma PT, Eerola J, Ahola S, et al. Mitochondrial DNA polymerase gamma variants in idiopathic sporadic Parkinson disease. *Neurology* 2007; 69: 1152–1159.
- [8] Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, et al. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet*. 2006; 38: 515–517.
- [9] Schapira AH, Gegg M. Mitochondrial contribution to Parkinson's disease pathogenesis. *Parkinsons Dis*. 2011; 2011: 159160.
- [10] Delgado-Alvarado M, de la Riva P, Jiménez-Urbieto H, et al. Parkinsonism, cognitive deficit and behavioural disturbance caused by a novel mutation in the polymerase gamma gene. *J Neurol Sci*. 2015; 350: 93–97.
- [11] Tzoulis C, Tran GT, Schwarzmüller T, et al. Severe nigrostriatal degeneration without clinical parkinsonism in patients with polymerase gamma mutations. *Brain* 2013; 136: 2393–2404.
- [12] Balicza P, Grosz Z, Bencsik R, et al. Significance of whole exome sequencing in the diagnostics of rare neurological diseases – own experiences through a case presenting with ataxia. [A teljes exomszekvenálás jelentősége a ritka neurológiai betegségek diagnosztikájában – saját tapasztalatok egy ataxiás eset kapcsán.] *Orv Hetil*. 2018; 159: 1163–1169. [Hungarian]
- [13] Mihály Zs, Gyórfy B. Next generation sequencing technologies (NGST) development and applications. [Következő generációs szekvenálási technológiák kifejlesztése és alkalmazásai.] *Orv Hetil*. 2011; 152: 55–62. [Hungarian]
- [14] Murgai AA, Jog MS. Can heterozygotes of autosomal recessive disorders have clinical manifestations? *Mov Disord*. 2018; 33: 1368–1369.
- [15] Ylönen S, Ylikotila P, Siitonen A, et al. Variations of mitochondrial DNA polymerase γ in patients with Parkinson's disease. *J Neurol*. 2013; 260: 3144–3149.
- [16] Postuma RB, Berg D, Stern M, et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2015; 30: 1591–1601.
- [17] Molnár MJ, Bencsik P. Establishing a Neurological-Psychiatric Biobank: Banking, informatics, ethics. *Cell Immunol*. 2006; 244: 101–104.
- [18] Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, et al. From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinform*. 2013; 43: 11.10.1–11.10.33.
- [19] Cingolani P, Platts A, Wang LL, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w¹¹¹⁸; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 2012; 6: 80–92.
- [20] Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44: D862–D868.
- [21] Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP v2.0: a database of human non-synonymous SNVs and their functional predictions and annotations. *Hum Mutat*. 2013; 34: E2393–E2402.
- [22] Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genom-

- ics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015; 17: 405–423.
- [23] Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, et al. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011; 13: 680–685.
- [24] Zabalza R, Nurminen A, Kaguni LS, et al. Co-occurrence of four nucleotide changes associated with an adult mitochondrial ataxia phenotype. *BMC Res Notes* 2014; 7: 883.
- [25] Hynynen J, Pokka T, Komulainen-Ebrahim J, et al. Variants p.Q1236H and p.E1143G in mitochondrial DNA polymerase gamma *POLG1* are not associated with increased risk for valproate-induced hepatotoxicity or pancreatic toxicity: a retrospective cohort study of patients with epilepsy. *Epilepsia* 2018; 59: 2125–2136.
- [26] Aitken H, Gorman G, McFarland R, et al. Clinical reasoning: blurred vision and dancing feet: restless legs syndrome presenting in mitochondrial disease. *Neurology* 2009; 72: e86–e90.
- [27] Davidzon G, Greene P, Mancuso M, et al. Early-onset familial parkinsonism due to *POLG* mutations. *Ann Neurol.* 2006; 59: 859–862.
- [28] Young MJ, Copeland WC. Human mitochondrial DNA replication machinery and disease. *Curr Opin Genet Dev.* 2016; 38: 52–62.
- [29] Orsucci D, Caldarazzo Ienco E, Mancuso M, et al. *POLG1*-related and other “mitochondrial Parkinsonisms”: an overview. *J Mol Neurosci.* 2011; 44: 17–24.
- [30] Synofzik M, Asmus F, Reimold M, et al. Sustained dopaminergic response of parkinsonism and depression in *POLG*-associated parkinsonism. *Mov Disord.* 2010; 25: 243–245.
- [31] Wilcox RA, Churchyard A, Dahl HH, et al. Levodopa response in Parkinsonism with multiple mitochondrial DNA deletions. *Mov Disord.* 2007; 22: 1020–1023.
- [32] Lill CM. Genetics of Parkinson’s disease. *Mol Cell Probes* 2016; 30: 386–396.
- [33] Lunati A, Lesage S, Brice A. The genetic landscape of Parkinson’s disease. *Rev Neurol (Paris).* 2018; 174: 628–643.
- [34] Tang S, Wang J, Lee NC, et al. Mitochondrial DNA polymerase mutations: an ever expanding molecular and clinical spectrum. *J Med Genet.* 2011; 48: 669–681.
- [35] Scuderi C, Borgione E, Castello F, et al. The in cis T251I and P587L *POLG1* base changes: description of a new family and literature review. *Neuromuscul Disord.* 2015; 25: 333–339.
- [36] Burusnukul P, de los Reyes EC. Phenotypic variations in 3 children with *POLG1* mutations. *J Child Neurol.* 2009; 24: 482–486.
- [37] Blok MJ, van den Bosch BJ, Jongen E, et al. The unfolding clinical spectrum of *POLG* mutations. *J Med Genet.* 2009; 46: 776–785.
- [38] Harris MO, Walsh LE, Hattab EM, et al. Is it ADEM, *POLG*, or both? *Arch Neurol.* 2010; 67: 493–496.
- [39] Da Pozzo P, Cardaioli E, Rubegni A, et al. Novel *POLG* mutations and variable clinical phenotypes in 13 Italian patients. *Neurol Sci.* 2017; 38: 563–570.
- [40] Phillips J, Courel S, Rebelo AP, et al. *POLG* mutations presenting as Charcot–Marie–Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst.* 2019; 24: 213–218.
- [41] Horvath R, Hudson G, Ferrari G, et al. Phenotypic spectrum associated with mutations of the mitochondrial polymerase gene. *Brain* 2006; 129: 1674–1684.

(Molnár Mária Judit dr.,
Budapest, Üllői út 78., 1083
e-mail: molnar.mariajudit@med.semmelweis-univ.hu)

„*Nemo immature moritur qui moritur miser.*”
(A szerencsétlen sosem hal korán.)



The Role of Genetic Testing in the Clinical Practice and Research of Early-Onset Parkinsonian Disorders in a Hungarian Cohort: Increasing Challenge in Genetic Counselling, Improving Chances in Stratification for Clinical Trials

Anett Illés¹, Dóra Csabán¹, Zoltán Grosz¹, Péter Balicza¹, András Gézsi¹, Viktor Molnár¹, Renáta Bencsik¹, Anikó Gál¹, Péter Klivényi² and Maria Judit Molnar^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Andrew Landstrom,
Duke University, United States

Reviewed by:

Jan O. Aasly,
Norwegian University of Science and
Technology, Norway
Avi Orr-Urtreger,
Tel Aviv Sourasky Medical Center,
Israel

*Correspondence:

Maria Judit Molnar
molnar.mariajudit@med.semmelweis-
univ.hu

Specialty section:

This article was submitted to
Genetic Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Genetics

Received: 30 April 2019

Accepted: 03 October 2019

Published: 31 October 2019

Citation:

Illés A, Csabán D, Grosz Z, Balicza P,
Gézsi A, Molnár V, Bencsik R, Gál A,
Klivényi P and Molnar MJ (2019)
The Role of Genetic Testing in the
Clinical Practice and Research of
Early-Onset Parkinsonian Disorders
in a Hungarian Cohort: Increasing
Challenge in Genetic Counselling,
Improving Chances in Stratification
for Clinical Trials.
Front. Genet. 10:1061.
doi: 10.3389/fgene.2019.01061

¹ Institute of Genomic Medicine and Rare Disorders, Semmelweis University, Budapest, Hungary, ² Department of Neurology, University of Szeged, Szeged, Hungary

The genetic analysis of early-onset Parkinsonian disorder (EOPD) is part of the clinical diagnostics. Several genes have been implicated in the genetic background of Parkinsonism, which is clinically indistinguishable from idiopathic Parkinson's disease. The identification of patient's genotype could support clinical decision-making process and also track and analyse outcomes in a comprehensive fashion. The aim of our study was to analyse the genetic background of EOPD in a Hungarian cohort and to evaluate the clinical usefulness of different genetic investigations. The age of onset was between 25 and 50 years. To identify genetic alterations, multiplex ligation-dependent probe amplification (n = 142), Sanger sequencing of the most common PD-associated genes (n = 142), and next-generation sequencing (n = 54) of 127 genes which were previously associated to neurodegenerative disorders were carried out. The genetic analysis identified several heterozygous damaging substitutions in PD-associated genes (*C19orf12*, *DNAJC6*, *DNAJC13*, *EIF4G1*, *LRRK2*, *PRKN*, *PINK1*, *PLA2G6*, *SYNJ1*). CNVs in *PRKN* and *SNCA* genes were found in five patients. In our cohort, nine previously published genetic risk factors were detected in three genes (*GBA*, *LRRK2*, and *PINK1*). In nine cases, two or three coexisting pathogenic mutations and risk variants were identified. Advances of sequencing technologies make it possible to aid diagnostics of PD by widening the scope of analysis to genes which were previously linked to other neurodegenerative disorders. Our data suggested that rare damaging variants are enriched versus neutral variants, among PD patients in the Hungarian population, which raise the possibility of an oligogenic effect. Heterozygous mutations of multiple recessive genes involved in the same pathway may perturb the molecular process linked to PD pathogenesis. Comprehensive genetic assessment of individual patients can rarely reveal monogenic cause in EOPD, although it may identify the involvement of multiple PD-associated genes in the background of the

disease and may facilitate the better understanding of clinically distinct phenocopies. Due to the genetic complexity of the disease, genetic counselling and management is getting more challenging. Clinical geneticist should be prepared for counselling of patients with coexisting disease-causing mutations and susceptibility factors. At the same time, genomic-based stratification has increasing importance in future clinical trials.

Keywords: Parkinson's disease, next-generation sequencing, genetic risk, monogenic forms, risk factors, early-onset, Parkinsonism, Parkinsonian disorders

INTRODUCTION

Parkinsonian disorders are a group of progressive neurodegenerative movement disorders, in which pathogenesis both genetic and environmental factors play a role. Parkinson's disease is the most common among them which responsible for approximately 80% of patients with Parkinsonism. The differential diagnosis of Parkinsonism from common idiopathic Parkinson's disease generally stands challenges for clinicians, because of heterogeneous phenotypes (motor and nonmotor symptoms), related comorbidities, and the absence of specific biomarkers (Klein and Schlossmacher, 2006). Consequently, in this study, the term Parkinsonian disorders (PDs) is used for expressing the different forms of Parkinsonism, which include both Parkinson's disease and Parkinson-plus syndromes. Until now, several genes were linked to different PD phenotypes, which may provide a new possible tool for clinicians to distinguish the specific patterns of symptoms or disease course. Moreover, it is important to emphasise that, even the similar involvement of these disease-genes, the clinical phenotype can be variable, although it differs considerably from that of idiopathic PD (Klein, 2005). Furthermore, other movement disorders can sometimes mimic PD phenotype, which also could make more difficult to set up the proper diagnosis without an effective aid by biomarkers.

Studies with familial and sporadic cases identified large number of genetic factors, which are usually not ready to be considered for everyday clinical practice. Based on previous studies, the rare, highly penetrant pathogenic mutations result in monogenic familial forms, although sporadic forms are commonly caused by interactions of environmental and genetic risk factors (Karimi-Moghadam et al., 2018). Over the past few years, the high-throughput next-generation sequencing (NGS) technology pave the way to identify the involvement of several candidate genes in the development of PD (Shulska et al., 2018). Dysfunctional protein products resulting from rare mutations with functional consequence in these genes are generally involved in the mitochondrial and protein quality control processes, synaptic transmission, and vesicular recycling pathways related to the homeostasis of neurons. Although, more and more knowledge is gathered in the field of the underlying pathogenesis of PD, and extensive testing of candidate genes is

in progress, the genetic background still remains unidentified in 40% of all PD-affected cases (Karimi-Moghadam et al., 2018).

Until now, the nature of inheritance was precisely defined in several early-onset PD (EOPD) forms: autosomal dominantly inherited PD (AD-PD) is associated with the mutations of *LRRK2*, *SNCA*, *VPS35*, *ATXN2*, and *GCH1* genes, autosomal recessive form of PD (AR-PD) with mutations of *PRKN*, *PINK1*, *PARK7*, *ATP13A2*, *PLA2G6*, *FBXO7*, *DNAJC6*, *SPG11*, *SYNJ1*, and *VPS13C* genes (Spatola and Wider, 2014; Lill, 2016; Lunati et al., 2018). Regarding the implication of candidate genes in pathogenesis of PD, the available evidences are often not fully convincing. In fact, further functional studies are needed to clarify their direct role (such as in the case of *DNAJC13*, *TMEM230*, *UCHL1*, *RIC3*, *HTRA2*, *GIGYF2*, *CHCHD2*, *EIF4G1*, *PTRHD1*, *PODXL*, *ABCA7*, and *DCTN1*) (Araki et al., 2014; Nuytemans et al., 2016; Cardona and Perez-Tur, 2017; Puschmann, 2017; Lunati et al., 2018).

Monogenic forms of PD are detected relatively rarely, even in cases where early-onset and/or familial accumulation suggests a strong heritability. In the recent years, the better availability of NGS has made it possible for new candidate genes to be identified in the background of PD. Analysis of genomic data has revealed that rare variants in genes that are linked to PD could provide new biological insight into the complex genetic aetiology of the disease. Genetic testing may play an increasing role, both in the counselling of individual patients and their families with respect to the expected disease course and recurrence risks, and in the stratification of patient groups in clinical trials (Gasser, 2015).

The aim of this study was to analyse the genetic background of EOPD in a Hungarian cohort of patients and to evaluate the clinical utility of different genetic investigations. To maximise the possibility to find potential causative mutations early-onset (25–50 age of onset) and/or positive familiar history were the most important selection criteria. Our cohort was analysed by covering the most frequent PD-associated genes with Sanger sequencing and MLPA analysis. Moreover, we also examined the possible involvement of other genes which may relate with PD by performing NGS experiments. To date, it has been the first comprehensive genetic study on Hungarian patients with PD that exploits the opportunities provided by the NGS method.

MATERIALS AND METHODS

Studied Cohort

Our study involved 142 Hungarian patients, who were diagnosed with early-onset (age of onset: 25–50) Parkinsonism based

Abbreviations: ACMG, American College of Medical Genetics; AOO, age of onset; D, damaging; DNAJC13, DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13; EIF4G1, eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1; F, familiar aggregation; f, female; het, heterozygous; LP, likely pathogenic; LRRK2, leucine rich repeat kinase 2; m, male; MAF, minor allele frequency; P, pathogenic; RF, risk factor; US, uncertain significance. *Firstly reported in this study.

on Movement Disorder Society (MDS) criteria (bradykinesia in combination with either resting tremor, rigidity, or both) (Postuma et al., 2015). Every case was examined by a board-certified neurologist. Our cohort included 64 females (16 familial and 48 sporadic) and 78 males (17 familial and 61 sporadic), the mean age of onset in the whole cohort was 40.1 ± 6.92 (Table 1). In our cohort, a case was labelled as familial if PD was reported among first- or second-degree relatives. In 23 out of 33 familial cases, first-degree relatives were affected. All patients were born in Hungary and descended from Hungarian ancestors. Nonrelated healthy subjects ($n = 55$, mean AOO = 59.7 ± 17.80) and patients without any neurodegenerative symptoms ($n = 82$, mean AOO = 45.1 ± 15.47), who had available whole exome data, were screened as controls. In addition, we excluded secondary Parkinsonism caused by environmental factors.

Patients and controls were collected from NEPSYBANK of the Institute of Genomic Medicine and Rare Disorders at Semmelweis University (Molnar and Bencsik, 2006). Written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki was signed by patients and control subjects before blood collection and molecular genetic analysis were made. The study was approved by the Hungarian Scientific and Research Ethical Committee. Molecular genetic analysis was accomplished for diagnostic purposes in all investigated patients.

Molecular Genetic Analysis

DNA was extracted from blood using the QIAamp DNA blood kit, according to the manufacturer's protocol (QIAGEN, Hilden, Germany). The whole coding region and exon/intron boundaries of *PRKN* and *PINK1* and 14 exons of *LRRK2* gene (Nuytemans et al., 2010; Cruts et al., 2012), which contained all of the previously reported pathogenic substitutions, were analysed with Sanger sequencing using ABI Prism 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA). The genetic sequence was compared with the human reference genome (*PRKN*: ENST00000366898.5, NM_004562, *PINK1*: ENST00000321556.4, NM_032409, *LRRK2*: ENST00000298910.11, NM_198578) using NCBI's Blast[®] application. Exon dosage was pre-typed by using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA, SALSA MLPA Kit P051-D1 Parkinson; MRC Holland, Amsterdam, Netherlands) according to the protocol. Moreover, the most frequent *LRRK2* G2019S substitutions were screened by the same method.

Altogether, 127 genes (Supplementary Table 1), which were previously reported in connection with neurodegenerative diseases, were investigated by NGS. During the selection process of these genes, we focused on which were previously related to

PD pathogenesis, with high confidence, or potentially cause overlap neurodegenerative diseases.

DNA samples of 54 probands were analysed by whole exome sequencing (WES, $n = 14$) and targeted NGS ($n = 40$). Genomic DNA library preparation was performed using Agilent SureSelectQXT Human All Exon v5 reagents and SureSelectQXT Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the protocol. Library preparation was followed by NGS using Illumina HiSeq PE Cluster Kit v4 for cluster generation on cBot, HiSeq SBS Kit v4 for sequencing on HiSeq2500 system, and MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles) for sequencing on MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA).

Bioinformatics Analysis

Variant calling from the NGS data was performed by GATK HaplotypeCaller (version 3.3-0) following the GATK Best Practices Guidelines (Van der Auwera et al., 2013). Variant Call Format (VCF) files were annotated with the SnpEff software (Cingolani et al., 2012) and ClinVar database (Landrum et al., 2016). Variant filtration of exome sequencing data was carried out with VariantAnalyzer software developed by the Budapest University of Technology and Economics. The nature of novel alterations was established according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guideline (Kearney et al., 2011; Richards et al., 2015). The minor allele frequencies (MAFs) of the variants were taken into consideration, predominantly rare variants defined as their MAF did not exceed 1%. The MAF was assessed by the data of 1,000 Genomes Project (1KG), the Exome sequencing project (ESP), Exome Aggregation Consortium Database, and Genome Aggregation Database (gnomAD v2.1) using non-neuro (non-Finnish) population as a reference.

During the analysis, the next step was the selection of known disease associated variants, then nonsynonymous variants with deleterious prediction scores on the protein function were selected. Nonsynonymous alterations were classified based on the dbNSFP database (Liu et al., 2013)

Loss of function (nonsense, stop loss/stop gain, frameshift, canonical splice) variants and missense variants, which were predicted to be deleterious by multiple lines of computational evidence, were reserved for further analysis. The MAFs of the variants were taken into consideration, predominantly rare variants defined as their MAF did not exceed 1%. The MAF was assessed by the data of 1KG, the ESP, Exome Aggregation Consortium Database, and gnomAD using ALL population as a reference and neither population could have higher MAF than 1%. The variants which met these criteria and were also not present in the control group were considered as damaging and were validated by Sanger sequencing. Where family members were available, segregation analysis was carried out in the proband's family.

Statistical Analysis

Odds ratios (ORs) and 95% Confidence Intervals (CI) were calculated to estimate risks using Medcalc software (https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php). Quantitative variables were described using mean value \pm standard deviation (SD).

TABLE 1 | Hungarian patients with early-onset Parkinsonism.

	Number of sporadic cases (mean AOO \pm SD)	Number of familial cases (mean AOO \pm SD)
Male	61 (41.1 \pm 6.6)	17 (37.2 \pm 6.93)
Female	48 (40.9 \pm 6.62)	16 (38.1 \pm 7.92)

AOO, age of onset; SD, standard deviation.

We analysed the effect of rare variant burden on the age at onset of the disease. Namely, the age of onset of patients with zero (87 patient), one (46 patients), two filtered variants (8 patients) were compared with ANOVA test. As three co-occurring variants were only present in one patient, that patient was excluded from the statistical analysis.

To examine the possibility of oligogenic effect, we performed the following analysis. We calculated variant burden in individuals, who underwent NGS (either targeted panel sequencing or WES), where the same set of genes were assessed, which were covered also by the PD-NGS panel (**Supplementary Table 1**). The following groups were created for the analysis: (1) Control group (in total, 124 individual): this consisted individuals without any disease (21 individual), patient with non-neurological diseases (45 patient), and patients with mitochondrial disorder (58 patient). (2) Non-PD neurodegenerative group (in total, 106 patients). These patients were diagnosed with a neurodegenerative disease, without symptoms of PD (such as hereditary spastic paraparesis, ataxia, amyotrophic lateral sclerosis, and dementia). (3) Patients with PD, who underwent NGS testing (54 patients). We defined variant burden as the total number of filtered variants in every gene represented on the NGS targeted panel (in total, 127 genes). Heterozygous variants were counted as 1 hit, homozygous variants as 2 hits. Summing all the hits in all the 127 genes resulted in the final variant burden. We tested the null hypothesis that the distribution of the individual variant burdens in the three groups (control, PD, non-PD neurodegenerative) came from the same sample with Kruskal-Wallis test. We calculated variant burden with an increasingly stringent filter criteria and tested statistical significance on every level for the three above defined group. The following filter criteria were created. (A) maximum MAF in any population is <1% AND effect of mutation is either loss of function (stop gain, stop loss, frameshift, canonical splice site) or missense. (B) The same filter as (A), but only those missense variants were counted, where multiple lines of computational evidence suggested damaging effect. (C) The same filter as (A), but only those variants were counted, which were present in a core PD gene list. These genes are the union of genes listed in the OMIM database or GeneReviews as associated with Mendelian forms of Parkinsonism, namely, *GBA*, *LRRK2*, *PARK7*, *PINK1*, *PRKN*, *SNCA*, *VPS13C*, *VPS35*, *ATP13A2*, *DNAJC6*, *FBXO7*, *SLC6A3*, *SYNJ1*, *DNAJC13*, *CHCHD2*, *PLA2G6*, *EIF4G1*. (D) The same filter as (C), but only those missense variants were counted, where multiple lines of computational evidence suggested damaging effect.

RESULTS

In our study, 142 unrelated probands with Parkinsonism were analysed, from which, 33 cases familial aggregation of neurodegenerative disorders were reported. The identified variants were classified into four groups: (1) rare damaging mutations in PD-associated genes, potentially compatible with a monogenic PDs; (2) previously reported genetic risk variants of PD; (3) multiple-hit mechanism impacting the risk of PD; (4) single heterozygous mutations in AR-PD-associated genes.

Rare Damaging Mutations in PD-Associated Genes, Potentially Compatible With a Monogenic PD

In the *PRKN* gene, exon 7 duplication were detected in four sporadic patients. In case of one sporadic patient, *SNCA* gene duplication was identified. All of the detected CNVs were classified as pathogenic based on ACMG classification guideline. A previously reported, *LRRK2* L1795F pathogenic mutation (Nichols et al., 2007) were detected in a single case (P15). In addition, novel damaging mutations were identified both in *LRRK2* (Y1649S) and *EIF4G1* (M1357T) genes in the P123 and P2 patients, respectively. The L2170W mutation in *DNAJC13* gene was classified as a variant with unknown significance, although Gustavsson et al. in 2015 suggested that this variant increase the genetic risk of PD (Gustavsson et al., 2015). Neither of these variants were detected in our control group and the two *LRRK2* (L1975F and Y1649S) mutations were not presented in gnomAD database. All the identified damaging SNVs were found in patients with familial aggregation. Clinical characteristics of the patients are reported in **Table 2**. Patients with *PRKN* exon 7 duplication, who are not involved in this Table, did not have atypical neurological symptoms. Two patients had equivalent, and two patients had akinetic-rigid type of PD. Mean age at onset in this group of patients was 42.25 ± 5.0 years. The P140 male patient has akinetic-rigid type of PD without any atypical symptoms (AOO = 44).

Previously Reported Genetic Risk Variants of PD

In our cohort, 25 sporadic cases were identified with previously published genetic risk variants in PD genes (22.94% of sporadic cases) (**Table 3**). This rate is approximately two times higher in familiar cases (45.46%), where 15 patients carried risk variants. In this Hungarian population, heterozygous *GBA* mutations, such as H294Q, E365K, T408M, N409S, and L483P variants, were identified in 10 patients (7.04%) and four controls (3.42%). The detected H294Q, L483P, and N409S *GBA* variants were published as pathogenic in biallelic form in GD. The T408M variant based on ClinVar is considered as benign, the E365K as VUS in GD; however, previous studies identified both of them as genetic risk variants for PD (Benitez et al., 2016; Barkhuizen et al., 2017). Moreover, one patient (P18) carried two previously published genetic PD risk variants in *GBA* gene. Among the *GBA* carriers, some patients had distinctive clinical features, such as supranuclear vertical gaze palsy (P25), nonmedication associated hallucinations (P19), depression and anxiety (P13, P18), and early cognitive dysfunction in two patients (P13, P24).

Segregation studies were successful in three cases: P10 had L483P/c.1448T>C mutation, his father, fraternal grandmother, and her sister carried the same rare variant in the *GBA* gene. The sister has late-onset PD with severe cognitive dysfunction. Other family members did not have any PD signs or symptoms. P13 harbours the H294Q/c.882T>G mutation. His grandfather and the brother of his grandfather had late-onset PD. We were able to analyse his father who has no signs of PD but carries the mutation. P25 patient carries the heterozygous T408M/c.1223C>T mutation.

TABLE 2 | Patients with rare substitutions in AD-PD-associated genes.

Patient ID	Form	AOO	Sex	Symptoms	Gene	Variant ID	Zygoty	Clinical significance	ACMG classification	MAF	Patients	Controls	Reference
P15	F	25	f	tremor, slower and altered handwriting, depression, anxiety	<i>LRRK2</i>	L1795F c.5385G>T rs111910483	het	P	LP	<0.01	1/142	0/117	(Nichols et al., 2007)
P123	F	34	m	hypomimia, tremor, rigidity, bradykinesia, postural instability, freezing, depression	<i>LRRK2</i>	Y1649S c.4946A>C –	het	D	LP	–	1/142	0/117	*
P46	F	30	m	tremor, rigidity, bradykinesia, decreased synkinesis of arms, depression	<i>DNAJC13</i>	L2170W c.6509T>G rs140537885	het	D/RF	US	<0.01	2/54	0/117	(Gustavsson et al., 2015)
P2	F	33	f	tremor, decreased synkinesis of arms	<i>EIF4G1</i>	M1356T c.4067T>C rs144059151	het	D	US	<0.01	1/54	0/117	*

For minor allele frequency (MAF), we used the *gnomAD* database non-neuro group (v2.1) of European population (non-Finnish). F, familiar aggregatio; f, female; m, male; *LRRK2*, leucine rich repeat kinase 2; *DNAJC13*, *DnaJ* heat shock protein family (*Hsp40*) member C13; *EIF4G1*, eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1; het, heterozygous; P, pathogenic; D, damaging; RF, risk factor; ACMG, American College of Medical Genetics; LP, likely pathogenic; US, uncertain significance; AOO, age of onset; MAF, minor allele frequency. *Firstly reported in this study.

TABLE 3 | Previously described genetic risk factors associated with PD.

Patient ID	Gene	Variant ID	Zygoty	MAF	Patients	Control	Sporadic	Familial	Mean AOO	OR	p	Reference
P10	<i>GBA</i>	L483P c.1448T>C rs421016	het	<0.01	1/54	0/137	–	1	27	7.7	0.21	(Benitez et al., 2016)
P13	<i>GBA</i>	H294Q c.882T>G rs367968666	het	<0.01	1/54	0/137	–	1	30	7.7	0.21	(Benitez et al., 2016)
P16, P17	<i>GBA</i>	E365K c.1093G>A rs2230288	het	0.01	2/54	1/137	2	–	47	5.2	0.18	(Barkhuizen et al., 2017; Benitez et al., 2016)
P8, P18, P23, P24, P25	<i>GBA</i>	T408M c.1223C>T rs75548401	het	<0.01	5/54	2/137	3	2	33.6	6.9	0.02	(Barkhuizen et al., 2017; Benitez et al., 2016)
P18, P19	<i>GBA</i>	N409S c.1226A>G rs76763715	het	<0.01	2/54	1/137	2	–	36	5.2	0.18	(Barkhuizen et al., 2017; Benitez et al., 2016)
P26, P31, P43, P104	<i>LRRK2</i>	M1646T c.4937T>C rs35303786	het	0.02	4/142	0/137	2	2	43.8	8.9	0.15	(Paisán-Ruiz et al., 2013)
P1, P6-P7, P14, P21-P22, P40-P41, P51, P57-P58, P61, P73-P76, P88, P110, P117, P121, P124, P11, P56, P62, P93	<i>LRRK2</i>	S1647T c.4939T>A rs11564148	hom	0.31	21/142	14/137	13	8	41.7	1.5	0.25	(Zheng et al., 2011)
P11, P56, P62, P93	<i>PINK1</i>	A340Tc.1018G > Ars3738136	het	0.05	4/142	12/137	3	1	39	0.3	0.04	(Wang et al., 2006)
P1, P28	<i>PINK1</i>	G411Sc.1231G > Ars45478900	het	<0.01	2/142	1/137	1	1	36.5	1.9	0.59	(Puschmann et al., 2017)

For minor allele frequency (MAF), we used the *gnomAD* database non-neuro group (v2.1) of European population (non-Finnish). AOO, age of onset; het, heterozygous; hom, homozygous; *GBA*, glucosylceramidase beta; *LRRK2*, leucine rich repeat kinase 2; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio; *PINK1*, *PTEN* induced kinase 1; p, probability value.

His brother with similar symptoms also carries this heterozygous substitution. The healthy mother has no mutation in the *GBA* gene, and the father died at the age of 41. The father's sibling also suffered from PD, so we supposed that the brothers inherited the c.1223C>T substitution from their father.

In the *LRRK2* gene, the heterozygous M1646T mutation was found in four patients compared to zero in control group. In 21 patients (14.8%), *LRRK2* S1647T substitution was detected in homozygous form, which were previously suggested to contribute PD risk (Zheng et al., 2011). However, it was also detected in our control group in homozygous form in 14 subjects (10.22%). The *PINK1* A340T polymorphism was identified in four cases among patients and in 12 control subjects. The G411S substitution was also detected in two cases and one control in our cohort.

Among all the detected, previously published genetic risk variants, all of it are associated with an OR > 1 in our cohort; however, we could only confirm two risk variants (*GBA* T408M and *PINK1* A340T), to be significantly more frequent in cases, compared to controls.

Multiple-Hit Mechanism Impacting the Risk of PD

It is hard to interpret multiple-hit mechanism on an individual level. However, we have observed in nine cases that heterozygous damaging mutations in AR-PD-associated genes coexisted with either a known risk or a rare variant in another PD-associated gene (Table 4). The coexistence of the *LRRK2* risk variant and an additional heterozygous missense mutation of *PRKN*, *PINK1*, or *SYNJ1* might be compatible to an oligogenic model. In three cases, *LRRK2* S1647T homozygous risk variant was present simultaneously with heterozygous *PRKN* (C446S), *PINK1* (R501Q), or *SYNJ1* (Q1163E) substitutions, respectively. In the case of P7 patient, we assume that the previously unpublished C446S mutation in *PRKN* gene is probably pathogenic based on the *in silico* prediction scores and segregation analysis. P7's father, who has later onset PD, was carrying heterozygous *PRKN* C446S and *LRRK2* S1647T mutations and P7's unaffected mother was carrying heterozygous *LRRK2* S1647T substitution. The *PINK1* R501Q alteration was consistently predicted as damaging. Finally, a rare damaging *SYNJ1* Q1163E substitution was found in a male patient with typical features of PD. In two other cases, the *LRRK2* M1646T alteration was identified with other PD-related mutations, such as *PRKN* heterozygous R234Q substitution with damaging prediction scores in P26 or a novel *DNAJC13* heterozygous D1301V damaging substitution in P43 (Table 4). We hypothesized that, if a genetic risk factor is concomitantly present with a rare heterozygous damaging mutation, it results in earlier onset of symptoms, compared to cases with a single PD risk variant.

In order to test the hypothesis of oligogenic inheritance pattern, we performed two analyses. Firstly, we tested with ANOVA, whether patients with more than one filtered genetic variant (presented in Table 4, in total nine patients) have different distribution of age at onset from those, who harbour only one filtered variants (presented in Tables 2, 3, and 5, in total 46 patients). We could only observed a trend to have lower mean and median age at onset with increasing number of filtered co-occurring variants; however, this did not reach the level of statistical significance (Figure 1A).

Secondly, we tested the hypothesis with the Kruskal-Wallis statistics, that in patients with Parkinsonism, there is a greater variant burden in PD-associated genes compared to non-PD neurodegenerative patients, and control individuals, as described in the Statistics section. Surprisingly, with the most relaxed filter criteria (MAF < 1%, AND loss of function or missense variants), we observed that there is a significantly greater number of variants in the control group (Figure 1B) compared to the PD-patient group. However, when we performed the analysis with a stringent filter criterion (MAF < 1% AND loss of function or damaging missense variant in core PD-genes), we observed that this difference diminished, and even seemed to turn around. However, this did not reach the level of statistical significance.

Single Heterozygous Mutations in AR-PD Associated Genes

In one sporadic case, pathogenic R275W heterozygous mutation was identified in *PRKN* gene, and in three sporadic cases, possible damaging substitution were identified in autosomal recessively inherited genes, such as *DNAJC6* (F414Y), *CP* (I898M), and *PLA2G6* (R396W) (Table 5). Notably, AOO is comparably high as it was seen in case where previously described genetic risk factors were solely presented (Table 3).

DISCUSSION

This is the first genetic epidemiology study targeting disease genes of early-onset PD in Hungary, in which several genetic alterations were identified in PD-associated genes. Since the monogenic forms cause only a minority of EOPD, there is a need to identify the most cost-effective diagnostic workup for these patients. Genetic analysis of Hungarian EOPD patients revealed mutations affecting several genes with varying degree of association, such as *DNAJC6*, *DNAJC13*, *EIF4G1*, *GBA*, *LRRK2*, *PRKN*, *PINK1*, *PLA2G6*, *SNCA*, and *SYNJ1*. Studying the functions of their protein products further elucidate the potential role and interplay in the pathomechanism of neurodegeneration, like mitochondrial dysfunctions and impaired autophagy-based protein or organelle degradation pathways, which indeed can lead to development of PD (Ryan et al., 2015).

The possibility to identify more than one rare variant in a PD patient is not uncommon based on our and others observations (Lubbe et al., 2016; Keogh et al., 2018) in the era of NGS. In our cohort, nine cases were presented with potential oligogenic interaction in the background of their symptoms, from which seven cases had a positive family history (Table 4). The coexistence of *LRRK2* M1646T or S1647T risk variants (Zheng et al., 2011; Paisán-Ruiz et al., 2013) with further heterozygous rare damaging missense mutations of *PRKN*, *PINK1*, or *SYNJ1* might suggest an oligogenic inheritance. The *LRRK2* risk variants with mutations in AR-PD-associated genes raised the possibility that maybe these explain the earlier age of onset in these patients. Further analysing the modifying effects of these risk variants, especially if they are associated with recessive heterozygous rare damaging mutation, could potentially clarify the PD prognosis. In our cases, oligogenicity was supposed if a patient had more

TABLE 4 | Double-hit mechanism impacting the risk of PD: Rare damaging variants and previously described genetic risk factors affecting more than one PD associated genes.

Patient ID	Form	AOO	Sex	Symptoms	Gene	Variant ID	Zygoty	Clinical significance	ACMG classification	MAF	Patients	Controls	Reference
P7	F	43	m	hyposmia, dysarthria, tremor, bradykinesia, postural instability, dysdiadochokinesis, MCI	<i>PRKN</i>	C446S c.1336T>A	het	D	P	–	1/142	0/137	*
					<i>LRRK2</i>	S1647T+ c.4939T>A rs11564148	hom	RF	–	0.31	21/142	14/137	(Zheng et al., 2011)
P26	F	40	f	tremor, postural instability, disturbed vision, MCI	<i>PRKN</i>	R234Q c.701G>A rs144032774	het	D	US	<0.01	1/142	0/137	*
					<i>LRRK2</i>	M1646T+ c.4937T>C rs35303786	het	RF	–	0.02	4/142	0/137	(Paisán-Ruiz et al., 2013)
P21	F	39	f	rigidity, bradykinesia, postural instability	<i>PINK1</i>	R501Q c.1502G>A rs61744200	het	D	US	<0.01	1/142	0/137	(Marongiu et al., 2008)
					<i>LRRK2</i>	S1647T+ c.4939T>A rs11564148	hom	RF	–	0.31	21/142	14/137	(Zheng et al., 2011)
P22	F	37	m	dysarthria, hypophonia, bradykinesia, tremor, RBD, medication associated fluctuations with OFF dystonia , panic attacks, MCI	<i>SYNJ1</i>	Q1163E c.3487C>G rs768503724	het	D	US	<0.01	1/54	0/137	*
					<i>LRRK2</i>	S1647T+ c.4939T>A rs11564148	hom	RF	–	0.31	21/142	14/137	(Zheng et al., 2011)
P43	S	38	f	tremor, rigidity, decreased synkinesis of arms	<i>DNAJC13</i>	D1301V c.3902A>T rs748182915	het	D/RF	LP	<0.01	1/54	0/137	*
					<i>LRRK2</i>	M1646T c.4937T>C rs35303786	het	RF	–	0.02	4/142	0/137	(Paisán-Ruiz et al., 2013)
P18	S	31	m	tremor, bradykinesia, rigidity, frequent freezing, depression , anxiety	<i>GBA</i>	T408M+ c.1223C>T rs75548401	het	RF	–	<0.01	5/54	2/137	(Barkhuizen et al., 2017; Benitez et al., 2016)
					<i>GBA</i>	N409S+ c.1226A>G rs76763715	het	RF	–	<0.01	2/54	1/137	(Barkhuizen et al., 2017; Benitez et al., 2016)
P20	F	39	m	tremor, rigidity, Parkinsonian gait, anxiety, MCI	<i>PLA2G6</i>	V630G c.1889T>G	het	D	P	–	1/54	0/137	*
					<i>DNAJC13</i>	R2115Q c.6344G>A rs770715465	het	D/RF	US	<0.01	1/54	0/137	(Vilariño-Güell et al., 2014)
P4	F	39	f	dysarthria, tremor, postural instability, bradykinesia, rigidity, orthostatic hypotension , low iron level , MCI	<i>C19orf12</i>	L61* c.182T>G	het	P	P	–	1/54	0/137	*

(Continued)

TABLE 4 | Continued

Patient ID	Form	AOO	Sex	Symptoms	Gene	Variant ID	Zygoty	Clinical significance	ACMG classification	MAF	Patients	Controls	Reference
P8	F	39	m	tremor, bradykinesia, dysidiadochokinesis, decreased synthesis of arms	SYNJ1	E67A c.200A>C rs199750187	het	D	US	<0.01	1/54	0/137	*
					DNAJC6	M133L c.397A>T rs61757223	het	D	US	<0.01	1/54	0/137	*
					DNAJC13	L2170W c.6509T>G rs140537885	het	D/RF	US	0.01	2/54	0/137	(Gustavsson et al., 2015)
					GBA	T408M* c.1223C>T rs386626586	het	RF	-	<0.01	5/54	2/137	(Barikhuizen et al., 2017; Benitez et al., 2016)

In this table, the coexisting rare damaging variants and previously described genetic risk factors in different PD associated genes are presented. ACMG classification was not applied in case of previously described genetic risk factors. For minor allele frequency (MAF), we used the gnomAD database non-neuro group (v2.1) of European population (non-Finnish). The distinctive phenotypic features are indicated with bold. ACMG, American College of Medical Genetics; AOO, age of onset; C19orf12, chromosome 19 open reading frame 12; D, damaging; DNAJC13, DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C13; DNAJC6, DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6; F, familial aggregation; f, female; GBA, glucosylceramidase beta; het, heterozygous; hom, homozygous; LP, likely pathogenic; LRRK2, leucine rich repeat kinase 2; m, male; MAF, minor allele frequency; MCI, mild cognitive impairment; P, pathogenic; PINK1, PTEN induced kinase 1; PLA2G6, phospholipase A2 group VI; PRKN, parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase; RBD, REM (rapid eye movement) behaviour disorder; RF, risk factor; S, sporadic case; SYNJ1, synaptotagmin 1; US, uncertain significance. *Firstly detected in this study. + Previously identified as genetic risk factor in the refereed publications.

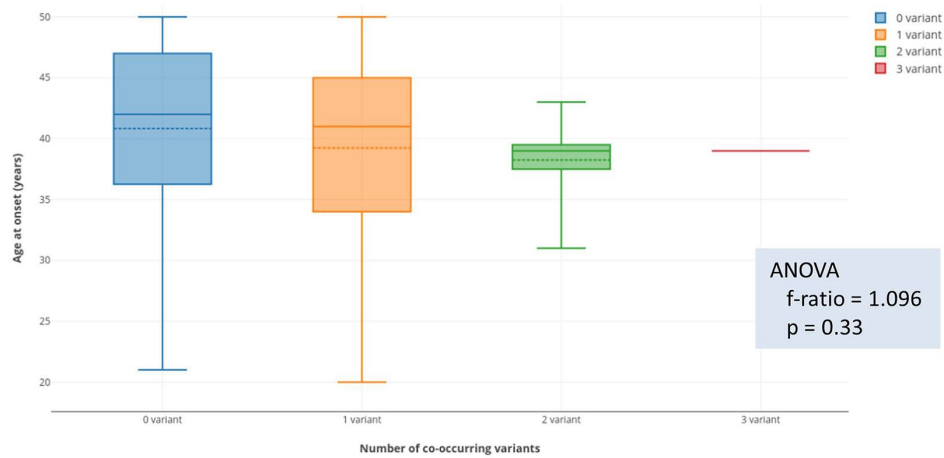
than one variant (either rare damaging or common risk variant) in different PD-associated genes. Although these observations are interesting, it is hard to interpret them on an individual level. In order to support statistically the possibility of an oligogenic effect, we tested two hypotheses. We asked, whether those patients, who simultaneously carry more than one PD-associated variant, have earlier age at onset. We could observe a trend, however, this did not reach statistical significance (Figure 1A). The second question we asked was, whether patients, who are diagnosed with PD, more commonly carry rare variants in PD-associated genes compared to other patients with neurodegenerative diseases or controls. Surprisingly, we have observed that more rare variants were detected if a permissive filter criterion was defined, but this difference diminished with more stringent filter criteria. When we applied a rigorous filter criterion, it even seemed that this trend turns around; however, this did not reach statistical significance (Figure 1B). Furthermore, we observed a potential trend in our cohort, that those patients with co-occurring variants had a greater chance for being labelled as familial. In summary, we can only raise the suspicion of an oligogenic effect, but probably much larger cohort are needed to prove this unequivocally.

It has to be emphasised, that limitation of statistical comparison, which is not only the small number of cases (as only 54 of our patients were analysed by NGS; thus, it is possible that they may harbour additional variants in genes that were not covered). But, the different penetrance of the coexisting genetic risk factors (e.g., the low penetrance LRRK2 S1647T versus a pathogenic GBA H294Q mutation), and these tests need to be repeated in larger samples.

The MLPA analysis identified five cases with pathogenic mutation from the 142 EOPD patients (3.5%), while Sanger sequencing revealed potential damaging mutation of LRRK2 in two cases and risk variants in PINK1 and LRRK2 genes in 28 cases (19.7%). Co-occurring variants were detected in three patients (2.1%). A heterozygous PRKN mutation was detected in a single case (0.7%). The NGS of 54 patients revealed mutations affecting several other PD-associated genes (CP, C19ORF12, DNAJC6, DNAJC13, EIF4G1, GBA, PLA2G6, SYNJ1). Two patients carried heterozygous variants in AD-PD genes (3.7%; LRRK2, DNAJC13, EIF4G1), while 10 patients carried GBA mutations (18.5%). Six patients were identified with potential oligogenic interactions with the coexistence of genetic risk factor or heterozygous rare variants in PD-associated genes (11.1%). Three patients carried a single heterozygous mutation in an AR-PD gene (5.6%). Altogether, we conclude that whole exome sequencing potentially increased the number of relevant findings.

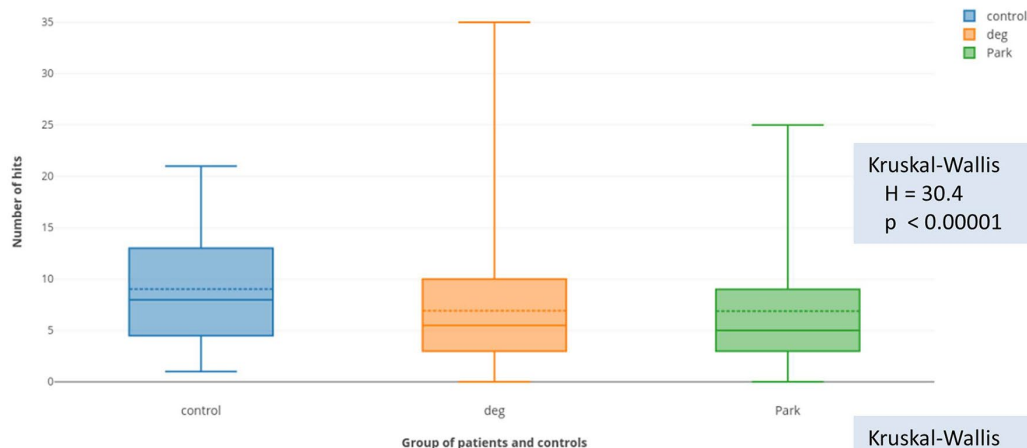
Among the 109 sporadic cases, five patients have CNVs in PRKN or SNCA genes. Deletions and duplications/triplications of one exon or exon groups account for a significant proportion of mutations in the PRKN gene (Shulskaya et al., 2017). In a Dutch cohort, the exon 7 duplication was suggested to be a founder mutation based on haplotype analysis and shared similar breakpoints (Elfferich et al., 2011). The importance of CNVs in PRKN gene was supported by our results as well, since 23.5% of our solved cases (consistent either to oligogenic or AD inheritance) harboured PRKN exon rearrangement, which were presumed to be more deleterious, because they caused altered

A Analysis of the effect of simultaneously occurring variants on the age at onset



B Analysis of variant burden in different group of patients / controls

MAF<1% AND (Loss of function OR Missense)



MAF<1% AND (Loss of function OR damaging missense) in core PD Genes

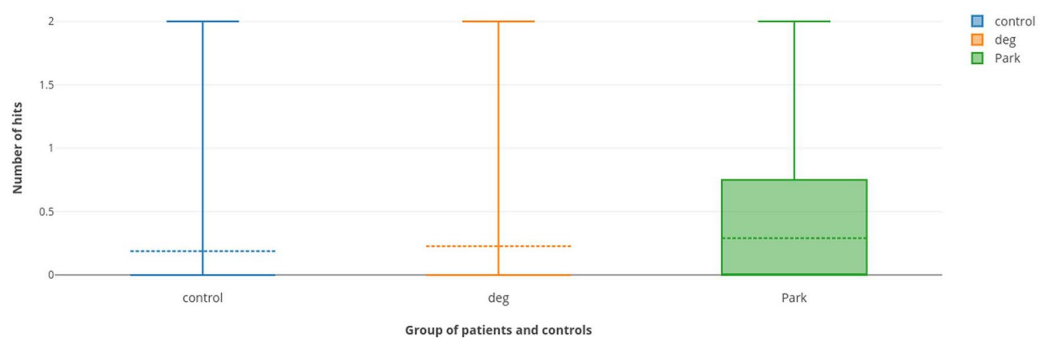


FIGURE 1 | Results of the analysis of oligogenic effects. Panel **(A)** shows the result of analysis coexisting variants (multiple-hits) on the age at onset. The box plots show the distribution of the age at the onset of symptoms if zero, one, two, or three simultaneous variants were present. Solid lines show medians and dashed lines the means. Differences between groups were not significant with ANOVA test. Panel **(B)** shows variant burden in the groups defined at the Methods section. Deg = patients with neurodegenerative diseases, without signs of Parkinsonism. Park = patients with Parkinsonism. We present the results with the least and most stringent filter criteria set. On the upper part of panel **(B)** (less stringent filters), we can see that more variants were present in the control group, which actually reached the level of statistical significance. On the lower part of panel **(B)** (most stringent applied filters), we can see that this difference diminished and even seemed to turn-around; however, in this case, the difference was not significant.

TABLE 5 | Possibly relevant rare heterozygous variants in AR genes implicated in PD susceptibility.

Patient ID	Form	AOO	Sex	Symptoms	Gene	Variant ID	Zygoty	Clinical significance	ACMG classification	MAF	Patients	Controls	OR	p	Reference
P27	S	35	f	rigor, hypokinesia, tremor, incontinence, swallowing difficulties, hyposmia, low serum CP level	CP	I898M c.2694T>G	het	D/RF	LP	-	1/54	0/137	7.7	0.21	*
P36	S	42	f	bradykinesia, postural instability, impaired sense of smell, dysarthria, MCI	DNAJC6	F414Y c.1241T>A	het	D/RF	LP	-	1/54	0/137	7.7	0.21	*
P100	S	42	m	tremor, rigidity, bradykinesia, postural instability	PRKN	R275W c823C>T rs34424986	het	P/RF	LP	<0.01	1/142	0/137	2.9	0.65	(Abbas et al., 1999)
P9	S	49	m	hallucinations, proximal weakness of legs, spasticity, incontinence. MRI: severe white matter lesions	PLA2G6	R39W c.115C>T rs763352728	het	D/RF	LP	<0.01	1/54	0/137	7.7	0.21	*

For minor allele frequency (MAF), we used the *gnomAD* database non-neuro group (v2.1) of European population (non-Finnish). The distinctive phenotypic features are indicated with bold. *ACMG*, American College of Medical Genetics; *AOO*, age of onset; *CP*, ceruloplasmin; *D*, damaging; *DNAJC6*, *DnaJ* heat shock protein family (Hsp40) member C6; *F*, female; *het*, heterozygous; *LP*, likely pathogenic; *m*, male; *MAF*, minor allele frequency; *OR*, odds ratio; *P*, pathogenic; *p*, probability value; *PLA2G6*, phospholipase A2 group VI; *PRKN*, parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase; *RF*, risk factor; *S*, sporadic case. *Firstly detected in this study.

PRKN protein function by reorganising the protein structure (Pankratz et al., 2011). These findings suggest that examination of CNVs in most frequently affected genes may be cost-effective in routine clinical practice for diagnosing PD and could be offered as a first step if the genetic workup is considered.

Moreover, PD susceptibility factors in *GBA*, *LRRK2*, and *PINK1* genes were relatively common in our cohort. These variants can be important from clinical point of view since some of them may serve as an important factor for stratification for clinical trials, such as *GBA*, others may contribute as modifiers to the complex aetiology of the disease. Most of the potential genetic risk factors of PD have been detected in genes which were previously associated with Mendelian inherited PD. According to the hypothesis of Sparato et al. (2017), genes harbouring both causal mutations for Mendelian disorders and risk variants for complex diseases may have high functional relevance in the pathogenesis (Sparato et al., 2017). In our cohort, we observed a similar frequency of genetic risk variants as reported in the literature (Karimi-Moghadam et al., 2018). In the future, potential therapeutic intervention could be planned based on some genetic risk variants, similarly to glucosylceramide synthase (*GCS*) inhibition of *GBA* associated PD (Sardi et al., 2017).

In our study, we identified four rare damaging heterozygous mutations in AR genes (Table 5), which suggested a potential role in the PD pathogenesis (Makovac et al., 2016; Ferese et al., 2018). Other studies suggested that approximately 5%–10% of sporadic EOPD patients carried heterozygous mutation in AR-PD-associated genes (Periquet et al., 2003; Clark et al., 2006). In our cohort, similar distribution (7.21%) was detected. Furthermore, it remains a question of debate how heterozygous alteration in recessive genes could contribute to the development of EOPD. Some results indicated that heterozygous mutations may simply result in subclinical cellular dysfunction or predispose PD (West et al., 2002; Periquet et al., 2003; Hedrich et al., 2004). Additionally, single heterozygous mutations in *PRKN* and *PINK1* genes are considered minor genetic risk factors for developing PD and single heterozygous substitutions in *PRKN* gene have been described in sporadic, late-onset PD (Spatola and Wider, 2014). Furthermore, the previously described mutations can cause malfunction in the metabolism of dopamine in the striatum and brain network changes, leading to cognitive impairment (Hilker et al., 2001; Khan et al., 2002; Benbunan et al., 2004; Ricciardi et al., 2014; Makovac et al., 2016). Moreover, other authors suggested that heterozygous mutations in *PLA2G6* may also contribute to the susceptibility for developing PD (Ferese et al., 2018), as some *PLA2G6* heterozygous mutations were presented in PD patients (Bower et al., 2011; Lu et al., 2012). We assume that the I898M damaging mutation in the *CP* gene, which plays an important role in the iron and copper metabolism in the brain (Zhao et al., 2018), could intensify the risk of developing PD. These four patients in Table 5 with a mean AAO (42 ± 5.72 years) is rather like the sporadic patients with a single genetic risk variant presented in Table 3 with a mean AAO (40 ± 6.94 years) than the sporadic patients with potential oligogenic background (presented in Table 4 with a mean AAO 34.5 ± 4.95 years). Examining mutations in

AR-PD-associated genes may be essential to further specify the contribution of heterozygous mutations in patients with EOPD. Additional studies need to further elucidate whether these variants are potential AD-PD-inducing mutations, or they act as risk factor with coexisting genetic susceptibility and environmental effects. Exploring the function of monoallelic alterations in AR-PD may be crucial for possible future use of genetic data for improvement of genetic counselling in individualised settings.

The genetic testing in PD is complex and it depends on whether testing is being requested by someone who has PD or someone who has positive family history of PD, without symptoms of PD. The complexity is coming from the fact that several genes and risk factors are associated with PD. In many patients with PD, even if they have a family history for PD, the disease-causing abnormal genes cannot be detected. Notably, the genetic counselling is specially challenging in those cases where (1) several genetic risk factors or (2) a genetic risk factor and a heterozygous carrier status of a pathogenic or likely pathogenic mutation is coexisting (Figure 2). The co-segregation analysis of these coexisting rare variants can facilitate understanding the role of these variants. The *GBA* variants may have particular importance, based on the published data, it seems that, even in heterozygous status the variant, which has a more severe effect to the protein, has greater impact on the disease onset and progression (Zhang et al., 2018). The clinicians should

differentiate in counselling where a healthy person without any family history request the counselling asking the risk scores of different genetic disorders (among them PD), or a patient having PD asking the recurrence risk in the next generation, or if the genetic results of the relatives of a PD patients has to be interpreted. Nevertheless, the situation is complicated if the person has monoallelic deleterious rare variant in AR inherited PD. In cases having coexisting monoallelic rare pathogenic variant and alteration(s) in genes which could potentially increase PD susceptibility or having more than one rare variant in those genes the risk of disease development is greater. Furthermore, it is important to highlight those further gene-gene interactions and environmental factors also influence the manifestation of the genetic background. In some cases, potential disease-causing mutation in previously PD-associated gene will not ensure the occurrence of PD symptoms during the life of the patient due to the reduced penetrance. Additionally, it is crucial that the genetic counsellor must be familiar with all those distinctive phenotypic features which can be associated with the different PD-associated genes (e.g., *GBA*, *DNAJC6*, *SYNJ1*) since in some cases with likely pathogenic variants or VUS in PD-associated genes, the reverse phenotyping is an important task (Figure 2). In our cohort, not only *GBA* PD cases had distinctive clinical features, but a patient with heterozygous *PLA2G6* variant (P9) had hallucinations, proximal weakness in the lower extremity, spasticity, urinary incontinence (Table 5). MRI showed severe white matter

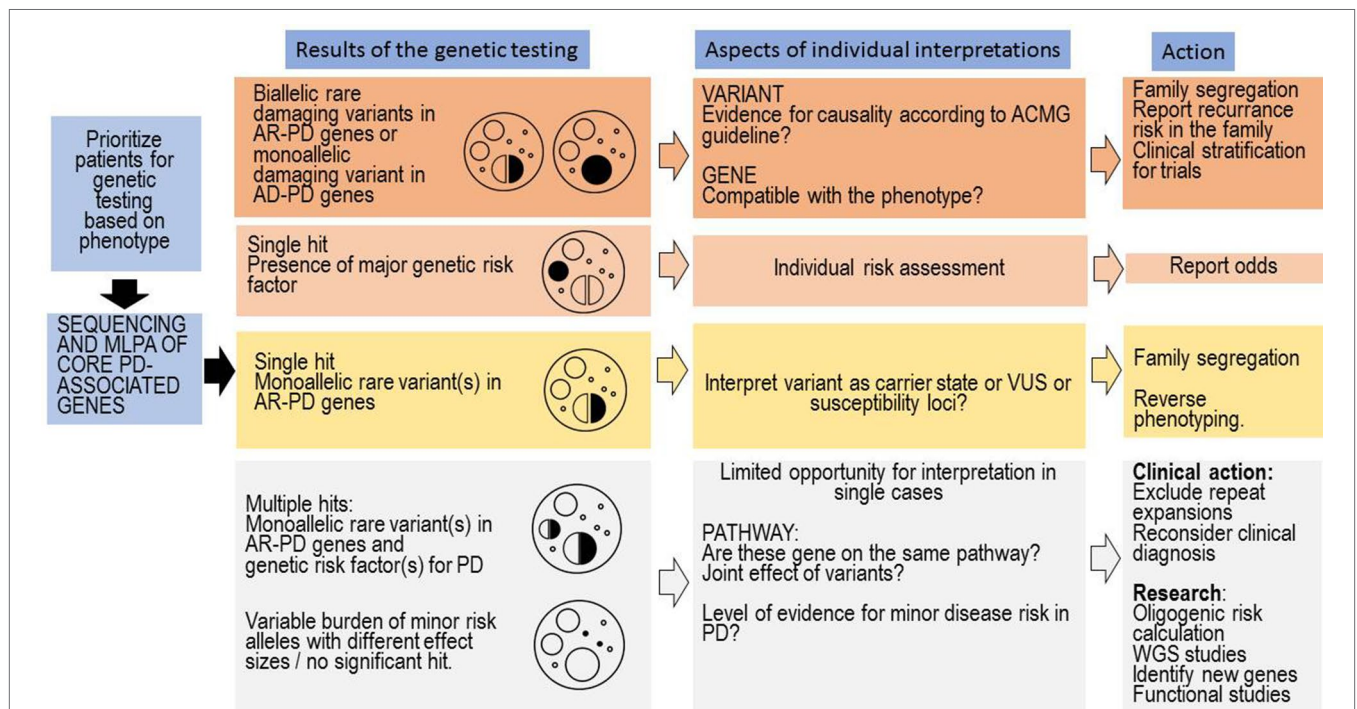


FIGURE 2 | Clinical interpretation of genetic test results and tasks associated with the genetic counselling. The first column represents the most common situations emerging after genetic testing in PD. On the top, we included the more easily interpretable findings, and on the bottom, the commonly emerging challenges. On every level, many aspects of the genetic findings have to be interpreted by the genetic counsellor, and we only included the major questions associated with a level. At the last column, we included important tasks of the genetic counsellors associated with a given level; however, naturally in every level, a complex approach is needed.

lesions. Early cognitive dysfunction was present in a patient (P22), who carried heterozygous variants in *SYNJ1* and *LRRK2* (Table 4). This patient also had early and severe medication associated fluctuations with frequent OFF dystonia. Orthostatic hypotension was early and severe in a patient with heterozygous *C19orf12* variant (P4) (Table 4). In a patient, who carried a heterozygous *CP* variant (P27) had low serum ceruloplasmin level. To collect all this type of phenotypic observations are very important for further understanding the genotype-phenotype correlations in PD.

To identify the genetic background is important not only in family planning but there is an increasing need in the era of the personalised medicine to stratify the patient based on their genetic background. There are clinical trials, which are focusing on the treatment of patients with certain genetic alterations, such as heterozygous *GBA* variants. Ideally, to reach personalised therapeutic interventions in the future, a systems biology approach would be optimal analysing multidimensional clinical and genetic/genomic risk and progression profile.

In summary, our study further supports the hypothesis that alterations in Mendelian PD-associated genes may act as a genetic risk factor for the sporadic form and even a heterozygous mutation in AR-PD genes could contribute to the disease susceptibility. With better availability of NGS technologies for clinical assessment, genetic testing is getting more important tool in the clinical practice and research of the EOPD. Application of NGS can effectively identify coexisting pathogenic rare variants and genetic susceptibility factors which could have significant role in understanding the complex pathogenesis of PD. The simultaneous analysis of neurodegeneration-associated genes could support both the diagnostic workup and the interpretation of clinically distinct phenocopies associated with certain single or coexisting genetic alterations and the spectrum of the neurodegenerative disorders. Due to the complexity of the disease and improving availability of NGS technologies, genetic counselling is getting more challenging by the increasing number of PD-associated rare variants. Thus, the clinical geneticist should be prepared for the genetic counselling of patients with coexisting disease-causing mutations and susceptibility factors. In the near future, coexistence of major disease-causing mutation and minor susceptibility factors could be interpreted at the level of individual.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this manuscript will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of Hungarian Scientific and Research Ethical Committee (37/2014 TUKEB) with written informed

consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was approved by the Hungarian Scientific and Research Ethical Committee.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AI and MM conceived and designed the study. ZG, PB, PK and MM acquired and analyzed the clinical data. AI, AGá, DC and RB performed the genetic data. AI, AGé and VM performed the bioinformatics analysis and interpreted the genetic data. AI wrote the draft of the manuscript and ZG, PB, DC, AGá, VM, AGé, PK and MM provided critical comments on the draft of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This study was supported from Research and Technology Innovation Fund by the Hungarian National Brain Research Program (KTIA_NAP_2017-1.2.1-NKP-2017-00002) and from Semmelweis University by “The development of scientific laboratories in medicine, health sciences and pharmacy” (EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009). The Variant Analyzer software development was supported by the Hungarian Scientific Research Fund (OTKA K-112915).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the participants and their families, whose help and participation made this work possible. The authors wish to thank to Benjamin Bereznai (Institute of Genomic Medicine and Rare Disorders, Semmelweis University, Budapest, Hungary), Tibor Kovács and Annamária Takáts (Department of Neurology, Semmelweis University, Budapest, Hungary), György Dibó (Department of Neurology, University of Szeged, Szeged, Hungary), Eszter Hidasi (Department of Neurology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary), István Balogh (Department of Laboratory Medicine, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary), Péter Diószeghy (András Jóna Teaching Hospital, Nyíregyháza, Hungary), for referring the patients with Parkinson's disease. The authors wish to thank Tünde Szosznayák and Margit Kovács for their expert technical assistance. We thank Szabolcs Udvari and Henriett Pikó who provided language editing of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.01061/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abbas, N., Lücking, C. B., Ricard, S., Dürr, A., Bonifati, V., De Michele, G., et al. (1999). A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French parkinson's disease genetics study group and the european consortium on genetic susceptibility in Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 8, 567–574. doi: 10.1093/hmg/8.4.567
- Araki, E., Tsuboi, Y., Daechsel, J., Milnerwood, A., Vilarino-Guelli, C., Fujii, N., et al. (2014). A Novel *DCTN1* mutation with late-onset parkinsonism and frontotemporal atrophy. *Mov. Disord.* 29, 1201–1204. doi: 10.1002/mds.25833
- Barkhuizen, M., Anderson, D. G., van der Westhuizen, F. H., and Grobler, A. F. (2017). A molecular analysis of the GBA gene in caucasian South Africans with parkinson's disease. *Mol. Genet. Genomic Med.* 5, 147–156. doi: 10.1002/mgg3.267
- Benbunan, B. R., Korczyn, A. D., and Giladi, N. (2004). Parkin mutation associated parkinsonism and cognitive decline, comparison to early onset Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 111, 47–57. doi: 10.1007/s00702-003-0079-6
- Benitez, B. A., Davis, A. A., Jin, S. C., Ibanez, L., Ortega-Cubero, S., Pastor, P., et al. (2016). Resequencing analysis of five Mendelian genes and the top genes from genome-wide association studies in Parkinson's Disease. *Mol. Neurodegener.* 11, 29. doi: 10.1186/s13024-016-0097-0
- Bower, M. A., Bushara, K., Dempsey, M. A., Das, S., and Tuite, P. J. (2011). Novel mutations in siblings with later-onset PLA2G6-associated neurodegeneration (PLAN). *Mov. Disord.* 26, 1766–1767. doi: 10.1002/mds.23617
- Cardona, F., and Perez-Tur, J. (2017). Other proteins involved in parkinson's disease and related disorders. *Curr. Protein Pept. Sci.* 18, 765–778. doi: 10.2174/1389203717666160311122152
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., et al. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 6, 80–92. doi: 10.4161/fly.19695
- Clark, L. N., Afridi, S., Karlins, E., Wang, Y., Mejia-santana, H., Harris, J., et al. (2006). Case-control study of the parkin gene in early-onset parkinson disease. *Arch Neurol.* 63, 548–552.
- Cruts, M., Theuns, J., and Van Broeckhoven, C. (2012). Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum. Mutat.* 33, 1340–1344. doi: 10.1002/humu.22117
- Elfferich, P., Verleun-Mooijman, M. C., Maat-Kievit, J. A., van de Warrenburg, B. P. C., Abdo, W. F., Eshuis, S. A., et al. (2011). Breakpoint mapping of 13 large parkin deletions/duplications reveals an exon 4 deletion and an exon 7 duplication as founder mutations. *Neurogenetics* 12, 263–271. doi: 10.1007/s10048-011-0302-9
- Ferese, R., Scala, S., Biagioni, F., Giardina, E., Zampatti, S., Modugno, N., et al. (2018). Heterozygous PLA2G6 mutation leads to iron accumulation within basal ganglia and parkinson's disease. *Front. Neurol.* 9, 536. doi: 10.3389/fneur.2018.00536
- Gasser, T. (2015). Usefulness of genetic testing in PD and PD trials: a balanced review. *J. Parkinsons. Dis.* 5, 1–7. doi: 10.3233/JPD-140507
- Gustavsson, E. K., Trinh, J., Guella, I., Vilarino-Guelli, C., Appel-Cresswell, S., Stoessl, A. J., et al. (2015). *DNAJC13* genetic variants in parkinsonism. *Mov. Disord.* 30, 273–278. doi: 10.1002/mds.26064
- Hedrich, K., Eskelson, C., Wilmot, B., Marder, K., Harris, J., Garrels, J., et al. (2004). Distribution, type and origin of Parkin mutations: review and case studies. *Mov. Disord.* 19, 1146–1157. doi: 10.1002/mds.20234
- Hilker, R., Klein, C., Ghaemi, M., Kis, B., Strotmann, T., Ozelius, L. J., et al. (2001). Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial Parkinsonism associated with mutations in the Parkin gene. *Ann. Neurol.* 49, 367–376. doi: 10.1002/ana.74
- Karimi-Moghadam, A., Charsouei, S., Bell, B., and Jabalameli, M. R. (2018). Parkinson disease from mendelian forms to genetic susceptibility: new molecular insights into the neurodegeneration process. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38, 1153–1178. doi: 10.1007/s10571-018-0587-4
- Kearney, H. M., Thorland, E. C., Brown, K. K., Quintero-Rivera, F., South, S. T., and Working Group of the American College of Medical Genetics Laboratory Quality Assurance Committee. (2011). American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet. Med.* 13, 680–685. doi: 10.1097/GIM.0b013e3182217a3a
- Keogh, M. J., Wei, W., Aryaman, J., Wilson, I., Talbot, K., Turner, M. R., et al. (2018). Oligogenic genetic variation of neurodegenerative disease genes in 980 postmortem human brains. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 89, 813–816. doi: 10.1136/JNNP-2017-317234
- Khan, N. L., Valente, E. M., Bentivoglio, A. R., Wood, N. W., Albanese, A., Brooks, D. J., et al. (2002). Clinical and subclinical dopaminergic dysfunction in PARK6-linked parkinsonism: An18F-dopa PET study. *Ann. Neurol.* 52, 849–853. doi: 10.1002/ana.10417
- Klein, C. (2005). Movement disorders: classifications. *J. Inher. Metab. Dis.* 28, 425–439. doi: 10.1007/s10545-005-7495-8
- Klein, C., and Schlossmacher, M. G. (2006). The genetics of Parkinson disease: implications for neurological care. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 136–146. doi: 10.1038/ncpneuro0126
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G., Chao, C., Chitipiralla, S., et al. (2016). ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res.* 44, D862–D868. doi: 10.1093/nar/gkv1222
- Lill, C. M. (2016). Genetics of Parkinson's disease. *Mol. Cell. Probes* 30, 386–396. doi: 10.1016/j.mcp.2016.11.001
- Liu, X., Jian, X., and Boerwinkle, E. (2013). dbSNFP v2.0: A database of human non-synonymous SNVs and their functional predictions and annotations. *Hum. Mutat.* 34, E2393–E2402. doi: 10.1002/humu.22376
- Lu, C.-S., Lai, S.-C., Wu, R.-M., Weng, Y.-H., Huang, C.-L., Chen, R.-S., et al. (2012). PLA2G6 mutations in PARK14-linked young-onset parkinsonism and sporadic Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* 159B, 183–191. doi: 10.1002/ajmg.b.32012
- Lubbe, S. J., Escott-Price, V., Gibbs, J. R., Nalls, M. A., Bras, J., Price, T. R., et al. (2016). Additional rare variant analysis in Parkinson's disease cases with and without known pathogenic mutations: evidence for oligogenic inheritance. *Hum. Mol. Genet.* 25, 5483–5489. doi: 10.1093/hmg/ddw348
- Lunati, A., Lesage, S., and Brice, A. (2018). The genetic landscape of Parkinson's disease. *Rev. Neurol. (Paris)*. 174, 628–643. doi: 10.1016/j.neurol.2018.08.004
- Makovac, E., Cercignani, M., Serra, L., Torso, M., Spanò, B., Petrucci, S., et al. (2016). Brain connectivity changes in autosomal recessive parkinson disease: a model for the sporadic form. *PLoS One* 11, e0163980. doi: 10.1371/journal.pone.0163980
- Marongiu, R., Ferraris, A., Ialongo, T., Michiorri, S., Soleti, F., Ferrari, F., et al. (2008). PINK1 heterozygous rare variants: prevalence, significance and phenotypic spectrum. *Hum. Mutat.* 29, 565. doi: 10.1002/humu.20719
- Molnar, M. J., and Bencsik, P. (2006). Establishing a neurological-psychiatric biobank: banking, informatics, ethics. *Cell. Immunol.* 244, 101–104. doi: 10.1016/j.cellimm.2007.02.013
- Nichols, W. C., Elsaesser, V. E., Pankratz, N., Pauciuolo, M. W., Marek, D. K., Halter, C. A., et al. (2007). LRRK2 mutation analysis in Parkinson disease families with evidence of linkage to PARK8. *Neurol.* 69, 1737–1744. doi: 10.1212/01.wnl.0000278115.50741.4e
- Nuytemans, K., Maldonado, L., Ali, A., John-Williams, K., Beecham, G. W., Martin, E., et al. (2016). Overlap between Parkinson disease and Alzheimer disease in ABCA7 functional variants. *Neurol. Genet.* 2, e44. doi: 10.1212/NXG.0000000000000044
- Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., and Van Broeckhoven, C. (2010). Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: A mutation update. *Hum. Mutat.* 31, 763–780. doi: 10.1002/humu.21277
- Paisán-Ruiz, C., Lewis, P. A., and Singleton, A. B. (2013). LRRK2: Cause, risk, and mechanism. *J. Parkinsons. Dis.* 3, 85–103. doi: 10.3233/JPD-130192
- Pankratz, N., Dumitriu, A., Hetrick, K. N., Sun, M., Latourelle, J. C., Wilk, J. B., et al. (2011). Copy number variation in familial parkinson disease. *PLoS One* 6 (8), e20988. doi: 10.1371/journal.pone.0020988
- Periquet, M., Latouche, M., Lohmann, E., Rawal, N., De Michele, G., Ricard, S., et al. (2003). Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain* 126, 1271–1278. doi: 10.1093/brain/awg136
- Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., et al. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 30, 1591–1601. doi: 10.1002/mds.26424
- Puschmann, A. (2017). New genes causing hereditary parkinson's disease or parkinsonism. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 17, 66. doi: 10.1007/s11910-017-0780-8
- Puschmann, A., Fiesel, F. C., Caulfield, T. R., Hudc, R., Ando, M., Truban, D., et al. (2017). Heterozygous PINK1 p.G411S increases risk of Parkinson's

- disease via a dominant-negative mechanism. *Brain* 140, 98–117. doi: 10.1093/brain/aww261
- Ricciardi, L., Petrucci, S., Guidubaldi, A., Ialongo, T., Serra, L., Ferraris, A., et al. (2014). Phenotypic variability of PINK1 expression: 12 Years' clinical follow-up of two Italian families. *Mov. Disord.* 29, 1561–1566. doi: 10.1002/mds.25994
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., et al. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* 17, 405–423. doi: 10.1038/gim.2015.30
- Ryan, B. J., Hoek, S., Fon, E. A., and Wade-Martins, R. (2015). Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem. Sci.* 40, 200–210. doi: 10.1016/j.tibs.2015.02.003
- Sardi, S. P., Viel, C., Clarke, J., Treleaven, C. M., Richards, A. M., Park, H., et al. (2017). Glucosylceramide synthase inhibition alleviates aberrations in synucleinopathy models. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 2699–2704. doi: 10.1073/pnas.1616152114
- Shulskaya, M. V., Shadrina, M. I., Fedotova, E. Y., Abramychyeva, N. Y., Limborska, S. A., Illarionovskiy, S. N., et al. (2017). Second mutation in PARK2 is absent in patients with sporadic Parkinson's disease and heterozygous exonic deletions/duplications in parkin gene. *Int. J. Neurosci.* 127, 781–784. doi: 10.1080/00207454.2016.1255612
- Shulskaya, M. V., Alieva, A. K., Vlasov, I. N., Zyrin, V. V., Fedotova, E. Y., Abramychyeva, N. Y., et al. (2018). Whole-exome sequencing in searching for new variants associated with the development of parkinson's disease. *Front. Aging Neurosci.* 10, 136. doi: 10.3389/fnagi.2018.00136
- Spataro, N., Rodriguez, J. A., Navarro, A., and Bosch, E. (2017). Properties of human disease genes and the role of genes linked to Mendelian disorders in complex disease aetiology. *Hum. Mol. Genet.* 26, 489–500. doi: 10.1093/hmg/ddw405
- Spatola, M., and Wider, C. (2014). Genetics of Parkinson's disease: the yield. *Park. Relat. Disord.* 20, S35–S38. doi: 10.1016/S1353-8020(13)70011-7
- Van der Auwera, G. A., Carneiro, M. O., Hartl, C., Poplin, R., del Angel, G., Levy-Moonshine, A., et al. (2013). From fastq data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. *Current Protocols in Bioinf.* 43 (1110), 11.10.1–33. doi: 10.1002/0471250953.bi1110s43
- Vilariño-Güell, C., Rajput, A., Milnerwood, A. J., Shah, B., Szu-Tu, C., Trinh, J., et al. (2014). DNAJC13 mutations in Parkinson disease. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1794–1801. doi: 10.1093/hmg/ddt570
- Wang, F., Feng, X., Ma, J., Zou, H., and Chan, P. (2006). A common A340T variant in PINK1 gene associated with late-onset Parkinson's disease in Chinese. *Neurosci. Lett.* 410, 121–125. doi: 10.1016/j.neulet.2006.09.080
- West, A., Periquet, M., Lincoln, S., Lücking, C. B., Nicholl, D., Bonifati, V., et al. (2002). Complex relationship between Parkin mutations and Parkinson disease. *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.* 114, 584–591. doi: 10.1002/ajmg.10525
- Zhang, Y., Shu, L., Zhou, X., Pan, H., Xu, Q., Guo, J., et al. (2018). A Meta-Analysis of GBA -related clinical symptoms in parkinson's disease. *Parkinsons. Dis.* 2018, 1–7. doi: 10.1155/2018/3136415
- Zhao, X., Shao, Z., Zhang, Y., Liu, F., Liu, Z., and Liu, Z. (2018). Ceruloplasmin in Parkinson's disease and the nonmotor symptoms. *Brain Behav.* 8, e00995. doi: 10.1002/brb3.995
- Zheng, Y., Liu, Y., Wu, Q., Hong, H., Zhou, H., Chen, J., et al. (2011). Confirmation of LRRK2 S1647T variant as a risk factor for Parkinson's disease in Southern China. *Eur. J. Neurol.* 18, 538–540. doi: 10.1111/j.1468-1331.2010.03164.x

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Illés, Csabán, Grosz, Balicza, Gézsi, Molnár, Bencsik, Gál, Klivényi and Molnar. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CASE REPORT

Open Access



Dynamic interaction of genetic risk factors and cocaine abuse in the background of Parkinsonism – a case report

Anett Illés¹, Péter Balicza¹, Viktor Molnár¹, Renáta Bencsik¹, István Szilvási² and Maria Judit Molnar^{1*} 

Abstract

Background: Parkinsonism is a complex multifactorial neurodegenerative disorder, in which genetic and environmental risk factors may both play a role. Among environmental risk factors cocaine was earlier ambiguously linked to Parkinsonism. Former single case reports described Parkinsonism in chronic cocaine users, but an epidemiological study did not confirm an increased risk of Parkinson's disease. Here we report a patient, who developed Parkinsonism in young age after chronic cocaine use, in whom a homozygous *LRRK2* risk variant was also detected.

Case presentation: The patient was investigated because of hand tremor, which started after a 1.5-year period of cocaine abuse. Neurological examination suggested Parkinsonism, and asymmetrical pathology was confirmed by the dopamine transporter imaging study. The genetic investigations revealed a homozygous risk allele in the *LRRK2* gene. After a period of cocaine abstinence, the patient's symptoms spontaneously regressed, and the dopamine transporter imaging also returned to near-normal.

Conclusions: This case report suggests that cocaine abuse indeed might be linked to secondary Parkinsonism and serves as an example of a potential gene-environmental interaction between the detected *LRRK2* risk variant and cocaine abuse. The reversible nature of the DaTscan pathology is a unique feature of this case, and needs further evaluation, whether this is incidental or can be a feature of cocaine related Parkinsonism.

Keywords: Parkinson's disease, Parkinsonism, cocaine, *LRRK2*, Genetic risk factor

Background

Pathomechanism of Parkinson's disease (PD), which is the second most common neurodegenerative disorder, is defined by the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra [1]. The dopaminergic system plays an important role in several vital mechanisms, such as movement control, cognition and controlling reward. For the normal functioning of dopaminergic neurons the dopamine reuptake is essential from the synaptic cleft into presynaptic neurons via dopamine transporters [2]. There are several drugs (such as cocaine) causing increased extracellular level of dopamine resulting in euphoric effects and motoric symptoms [3].

In case of PD, there are evidences, which suggest that dopamine transporter (DAT) dysregulation is also a

factor in the disease mechanism [4]. Cocaine enhances dopaminergic signalling as it binds to DAT and blocks the reuptake of dopamine from the synaptic cleft [5]. The suspected association between cocaine abuse and the increasing risk of PD was previously described in several patients [6] although there are several cases where despite cocaine abuse no correlation with PD was observed [7].

Although the evidences for higher risk of PD among cocaine users is controversial, it is already proved that the brain structure is altered and the conformation of alpha-synuclein become more compact [8]. In PD pathogenesis the misfolded alpha-synuclein plays crucial role in the death of dopaminergic neurons therefore in the progression of PD [9]. In cocaine abusers overexpression of alpha-synuclein has been described in dopaminergic neurons, potentially increasing the risk for degenerative changes in dopaminergic neurons [10]. As *SNCA* is one of the most common cause of PD there are possibility

* Correspondence: molnar.mariajudit@med.semmelweis-univ.hu

¹Institute of Genomic Medicine and Rare Disorders, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Full list of author information is available at the end of the article



that other genetic risk factors, such as *PARK2*, *LRRK2*, *PINK1* and *DJ-1* [11], also could contribute to the development of PD even in early age due to the cumulated effect of cocaine abuse and genetic risk.

DAT-SPECT (dopamine transporter single photon emission computed tomography) imaging enables differentiation of neurodegenerative causes of Parkinsonism, from other movement or tremor disorders where typically the DAT-SPECT study will be normal. Impaired function of DAT is reducing striatal binding of DaTSCAN, however it is not specific to PD. Several cocaine analogues labelled with ^{123}I sufficient for SPECT binds with high affinity to DAT [12]. The most common analogue in the clinical practice is ^{123}I -FP-CIT (DaTSCAN, GE Healthcare) [12]. The method can measure either the DAT density on the presynaptic terminal, or nigrostriatal fiber density.

In our case study we are discussing the association of the genetic and environmental factors in a cocaine user young patient with reversible Parkinsonian symptoms.

Case presentation

A 44 years old male patient was referred to our neurogenetic outpatient clinic, for examination of hand tremor. In the past medical history gastroesophageal reflux disease (Los Angeles grade A), LIV-V discus herniation and Type I (Wenckebach) second-degree atrioventricular block was present. The latter caused no symptoms, and no medical intervention was necessary. The patient took pantoprazol regularly. Before the onset of the hand tremor the patient used nasal cocaine regularly for a period of 18 month. He used ~ 1 g/day (15 mg/kg) with nasal insufflation. During the cocaine use irritability and insomnia, dissociative symptoms such as depersonalization and derealisation, developed. Because of the latter he stopped cocaine use 10 months before the examination. He realized his hand tremor approximately 3–4 months after cessation of the drug.

During the neurological examination hand tremor affected asymmetrically the right hand more than the left hand, and was mainly postural increasing with holding small weights. In addition, signs of mild Parkinsonism (mild bradykinesia and rigor in the right hand) was also detected. Altogether, the neurological examination suggested incipient Parkinsonism, but the tremor was atypical (not resting type). According to the MDS classification of tremors [13] it was classified as isometric tremor syndrome. From the family history, it is noticeable that the father of the patient suffered from postural hand tremor in older age. The son of our patient was examined because of restless leg syndrome at age 13 years. Routine blood studies were normal, including copper, ferritin and ceruloplasmin. Abdominal ultrasound was normal. Brain MRI (3 T) showed no structural or vascular lesions, basal ganglia were normal, but absence

of swallow tail sign was detected (Fig. 1), suggesting Parkinson's disease. For further clarification DaTscan was performed by a double-headed SPECT system (GE Infinia II with Xeleris workstation) using a standard acquisition protocol according to the EANM guideline [12] with 170 MBq I-123-Ioflupane tracer. This tracer has a high affinity not only to DAT but to the serotonin transporter (SERT) and norepinephrine transporter (NET) as well [14]. However, the concentration of DAT in the basal ganglia is much higher, than that of the other transporters, therefore its measure is appropriate for DAT. The striatal binding was evaluated both by semiquantitative visual evaluation and for a more accurate comparison the DaTQUANT software (created by GE Healthcare in 2013 adapted in 2015, as a quantitative binding method with normal database) has been used [15]. It showed asymmetrically decreased radiopharmakon binding on the right side in the caudate nucleus 3.0 h after intravenous injection of the I-123-Ioflupane (Fig. 2/a). During the time of the DaTscan no cocaine use has been reported. Although we had only self-report about the cocaine use, the long-term observation of the patient and the close follow-up with a good compliance, and the improvement of the clinical symptoms convinced us about the reliability of the anamnestic data.

For the genetic investigation DNA was isolated from blood with QIAamp DNA blood kit, according to the manufacturer's protocol (QIAGEN, Hilden, Germany). Sanger sequencing was performed in the whole coding region and exon/intron boundaries of *SNCA*, *PARK2* and *PINK1*, *LRRK2* gene by using ABI Prism 3500 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Exonic copy number variations were analyzed by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA, SALSA MLPA Kit P051-D1 Parkinson; MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands). In the *LRRK2* gene a homozygous risk factor variant, NM_198578.4:c.4939 T > A, p.Ser1647Thr (codon change: TCA > ACA) was detected [16]. The segregation analysis detected the S1647T *LRRK2* variant in heterozygous state in the parents of the patient. MLPA did not detect any exonic copy number variations. Based on the clinical and DaTscan findings we suspected Parkinson syndrome, associated with a toxic-genetic interaction. Selegiline was prescribed, but the patient omitted the medication, because the tremor was worsening from the drug. After 1 year of cocaine abstinence the tremor significantly decreased. One and half year after the first DaTscan a control investigation was performed, and showed normal radiopharmakon binding in the striatum, with only mild asymmetry. The right caudate binding returned into the normal range, and the right striatal binding was higher than at the first examination (Fig. 2/b).

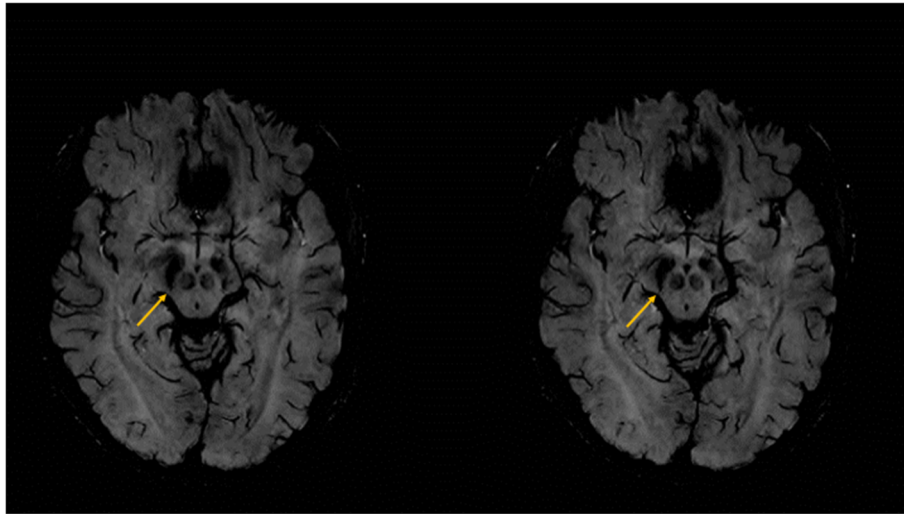


Fig. 1 Brain MRI of the patient. On the axial susceptibility weighted images in the plane of the mesencephalon, the substantia nigra is identifiable both sides. The swallow tail sign is normally present in 3 T imaging at the area indicated by the arrows, but it is absent in the patient

Discussion and conclusions

Cocaine use is associated with a range of movement disorders [3], and has complex effects on the central nervous system. Possible ways to categorize these effects is based on time characteristics, i.e. neurologic complications with acute or chronic use, or whether the patient is an active user, early or late abstinent. The main acute pharmacological effect of cocaine is dopamine (DA) reuptake inhibition, which elevates synaptic DA levels.

Literature information about cocaine's effect on dopamine transporter (DAT) level expression in human is scarce and available information from experimental animal studies are also contradictory at times. There are two possible mechanism supported by the literature, by which we tried to interpret our findings, i.e. the low DAT binding, which later normalized.

On one hand, in response to the elevated DA levels, DAT downregulation might take place, as a compensatory mechanism [17]. This compensatory mechanism decreases the acute DA elevation with the use of cocaine, but on the long term it leads to DA deficiency in the caudate nucleus and frontal cortex as DA synthesis and reuptake is both needed for synaptic storage [18]. In acute cocaine abstinence the DATs start to upregulate as shown by other DaTscan studies [19]. This might explain our results, why we have seen decreased DAT binding, which later normalized. In this scenario we hypothesize that DaTscan in our patient was performed in a time window when DAT levels are still decreased; however, the patient was already abstinent. As an acute withdrawal symptom decreasing DA level results in psychological symptoms, restlessness and tremor [20]. Long term use of cocaine however also results in DAT decrease, and this might explain Parkinsonian features in abstinence as a result of DA depletion.

On the other hand, other studies in the literature suggest, that cocaine increases DAT expression, and abstinence of cocaine intake for a prolonged period of time decreases DAT level [5]. In this scenario, we can hypothesize that we have seen the decreased DAT-binding, because the patient was already abstinent for a long time, and this change in the expression later normalized.

It should be mentioned that the above described mechanisms are speculative and the effects of cocaine on the nervous system is complex. We also need to consider changes in D2 receptor expression [21] and possible long-term structural damage to dopaminergic synaptic terminals [18]. Effects might be dose and formulation dependent, as neurologic complications are more common with the smokable alkaloidal form of cocaine, known as „crack” [22]. Acute blood pressure elevations and cerebral vasospasm might also cause cerebrovascular events, such as acute ischemic stroke, or aneurysm rupture [23], but small subclinical ischemic events may also cause structural damage in the brain. Chronic cocaine abuse lead to increased age-dependent temporal lobe cortical atrophy [24], and decreased frontal white matter connectivity [25] shown by imaging studies.

The association of cocaine use with Parkinsonism is nevertheless complicated, and the literature information is scarce. On one hand, the acute elevation of synaptic DA levels may ameliorate “off” periods in Parkinson's disease patients [26]. On the other hand chronic use was associated with Parkinsonian features in many case reports [20], although this was not confirmed by the epidemiological study of Callaghan et al. [27]. The above described mechanism suggests a pharmacological, reversible form of

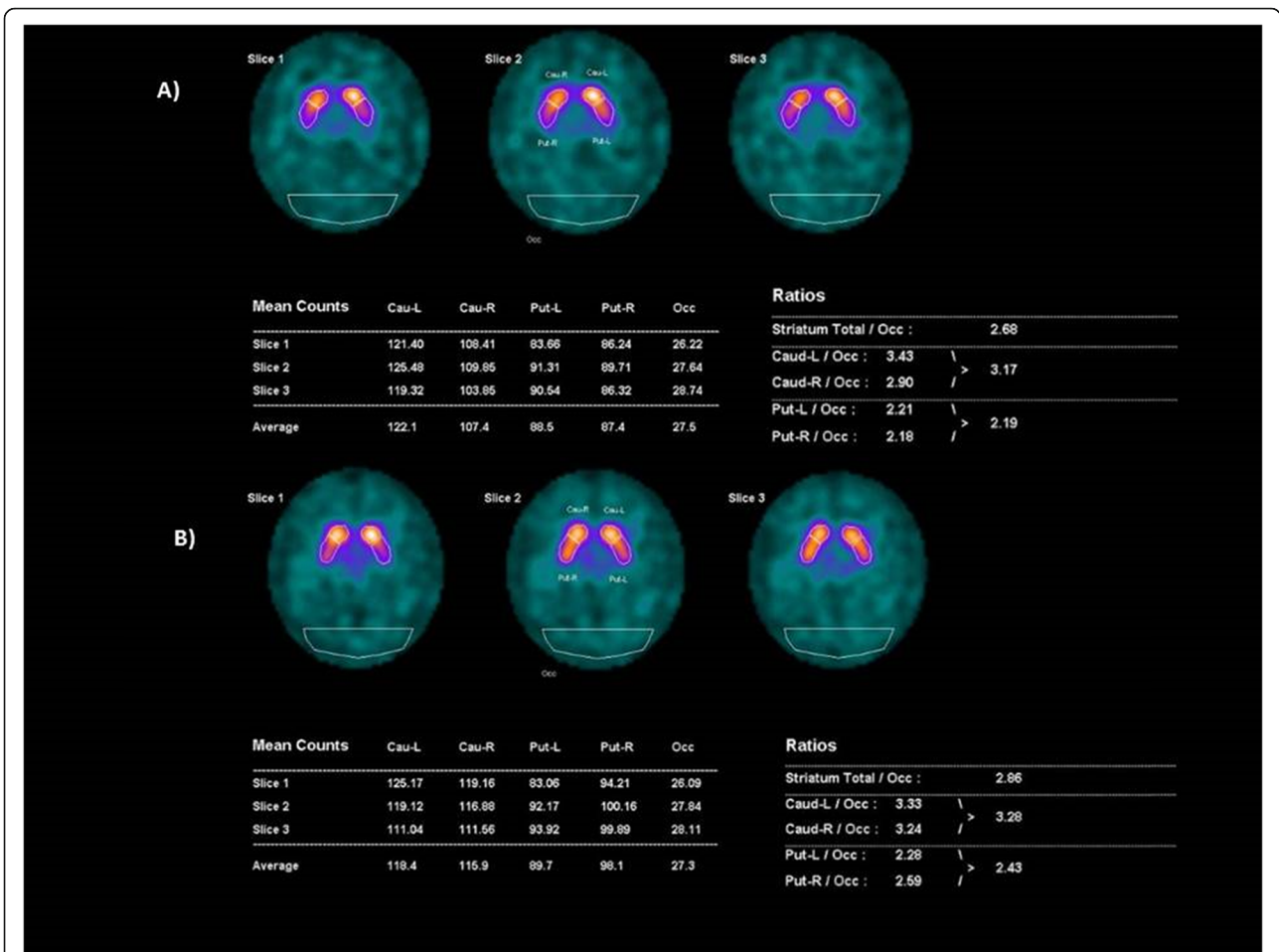


Fig. 2 DaTscan of the patient in two time points. The Figure shows the radiopharmakon binding in the area of the basal ganglions. The measurements and calculated ratios for quantitative analysis in the volumes of interest are also listed. Figure **a** was taken after the first examination of the patient. At this time decreased radiopharmakon binding was present in the right striatum (mainly the caudate). Figure **b** was taken after 1 year of cocaine abstinence. At this time point, normal binding is detectable in the right caudate

secondary Parkinsonism in our case. However, a further possible, non-pharmacologic link between Parkinsonism and chronic cocaine use might exist. Chronic cocaine exposure triggers alpha-synuclein overexpression [10], which might be an acute protective mechanism against increased oxidative stress, but which eventually lead to formation of Lewy bodies (LBs), and accelerated neurodegeneration. Besides, cocaine also physically binds to alpha-synuclein, which might cause deleterious conformational changes [8]. However, it is not probable, that these changes will cause reversible pathology on the DaTscan.

The long-term cocaine use has not the same effect as dopamine receptor blocking agents - DRBA, however these can induce also parkinsonism. Drug-induced Parkinsonism (DIP) should resolve after the causative agent has been withdrawn. Lim et al. [28] reported that Parkinsonism might persist for more than 6 months after discontinuation of the DRBA, and DaTscan showed normal striatal

dopamine transporter binding at that time. Nine months after the discontinuation of the dopamine receptor blocking agent, Parkinsonism was significantly improved in their patients but not completely resolved [28].

In a number of patients, with DIP symptoms persist or may even worsen over time, suggesting the development of concomitant PD. There are speculations that the possible neurotoxic effect of neuroleptics exerted on a susceptible dopaminergic system would lead to a progressive process. To which extent a personal susceptibility plays a role remains to be determined and further genomic studies in patients exposed to neuroleptics who develop DIP or PD could eventually identify a genetic background of susceptibility [29]. Even if the pathomechanism is not the same in the cocaine induced Parkinsonism and DIP the personal susceptibility can be an important factor.

In our case the PD associated genes were investigated since the patient has movement disorders in his family.

We detected only one genetic risk variant, which was previously associated with PD. The presence of this homozygous *LRRK2* polymorphism (S1647 T) has a very mild association with PD, with a low odds ratio (in our cohort OR: 1.787, 95% CI: 0.8052 to 3.96 – Illes et al., unpublished data). In the presence of this genetic risk variant, even in homozygous status, appearance of Parkinsonism is not likely, but hypothetically in the presence of some environmental factors, which may influence dopamine level it may present itself. Similar mechanism was suggested by Lin et al. [30] in a Taiwanese population, where the S1647 T variant was only associated to Parkinsonism when environmental exposures were included in the logistic regression model. Further published studies indicated also significant interactive effects between environmental factors and genetic variants [31]. These kind of interactions are well described in the case of the serotonin transporter polymorphism association with depression [32]. However, it should be kept in mind that proof of the additional effect of *LRRK2* S1647 T polymorphism and cocaine abuse goes beyond the framework of our case study.

It is interesting, that in our patient, the MRI already showed some structural changes (absence of the swallow tail sign), indicating the damage of nigrostriatal pathway, and thus the acute pharmacological effect of cocaine might be also altered. The family history of hand tremor in the father and restless-leg syndrome in the child also suggest some already existing non-pharmacologic risk at the patient.

In summary, this case report may raise the possibility of a gene-environment interactions in the background of our patient's symptoms. Our result suggests that some of these effects in the early state might partially reversible, as after a period of abstinence the patient's Parkinsonian symptoms resolved. However, the patient needs longitudinal follow-up, as PD might later reoccur, as the consequence of the chronic effects of cocaine, and the additive effects of the *LRRK2* alteration. Further studies of S1647 T alteration and environmental interaction in a larger Hungarian cohort and functional studies in in vivo models are warranted to validate our hypothesis.

Abbreviations

CI: Confidence interval; DA: Dopamine; DAT: Dopamine transporter; DaTscan: Dopamine transporter single photon emission computerized tomography; DAT-SPECT: Dopamine transporter single photon emission computed tomography; DIP: Drug-induced Parkinsonism; DJ-1: Daisuke-Junko-1; DNA: Deoxyribonucleic acid; DRBA: Dopamine receptor blocking agents; LB: Lewy Body; LRRK2: Leucine-rich repeat kinase 2; MDS: Movement Disorder Society; MLPA: Multiplex ligation-dependent probe amplification; MRI: Magnetic resonance imaging; NET: Norepinephrine transporter; OR: Odds ratio; PARK2: Parkinson protein 2 E3 ubiquitin protein ligase; PD: Parkinson's disease; PINK1: PTEN-induced putative kinase 1; SERT: Serotonin; SNCA: Alpha-synuclein; SPECT: Single-photon emission computed tomography

Acknowledgements

The authors thank the participant, whose help and participation made this work possible. The authors wish to thank Tünde Szosznyák and Margit Kovács for their expert technical assistance. This work was supported by grants from Research and Technology Innovation Fund by the Hungarian National Brain Research Program (KTIA_NAP_2017-1.2.1-NKP-2017-00002) and from Semmelweis University by "The development of scientific laboratories in medicine, health sciences and pharmacy" (EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009).

Authors' contributions

AI and MMJ conceived and designed the study. PB and MMJ acquired and analyzed the clinical data. AI, and RB performed the genetic data, ISz performed and interpreted the DaTscan examinations. AI, PB and VM designed the figures and interpreted the data. AI wrote the draft of the manuscript and PB, VM, RB, ISz and MMJ provided critical comments on the draft of the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Funding

This study was supported from Research and Technology Innovation Fund by the Hungarian National Brain Research Program (KTIA_NAP_2017-1.2.1-NKP-2017-00002) and from Semmelweis University by "The development of scientific laboratories in medicine, health sciences and pharmacy" (EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009). From these fundings we supported the genetic analysis.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

This manuscript is a retrospective case study, it has an institutional ethical committee approval. The study was performed in accordance with the declaration of Helsinki.

The Hungarian Research Ethics Committee approved the study. Approval number is: 44599-2/2013/EKU (535/2013.) The patient's gave written informed consent.

Consent for publication

Informed written consent for genetic testing and the use of the data for scientific publication was obtained from the patient.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Institute of Genomic Medicine and Rare Disorders, Semmelweis University, Budapest, Hungary. ²Department of Nuclear Medicine, Hungarian Defence Force Medical Center, Budapest, Hungary.

Received: 10 October 2018 Accepted: 13 October 2019

Published online: 28 October 2019

References

- Vaughan RA, Foster JD. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(9):489–96 [cited 2018 Jul 6] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23968642>.
- Ueno T, Kume K. Functional characterization of dopamine transporter in vivo using *Drosophila melanogaster* behavioral assays. *Front Behav Neurosci.* 2014;8:303 [cited 2018 Aug 15] Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnbeh.2014.00303/abstract>.
- Deik A, Saunders-Pullman R, Luciano MS. Substance of abuse and movement disorders: complex interactions and comorbidities. *Curr Drug Abuse Rev.* 2012;5(3):243–53 [cited 2018 Aug 15] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23030352>.
- Vaughan RA, Foster JD. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(9):489–96 [cited 2018 May 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23968642>.

5. Verma V. Classic Studies on the Interaction of Cocaine and the Dopamine Transporter. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2015;13(3):227–38 [cited 2018 May 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26598579>.
6. Lloyd SA, Faherty CJ, Smeysne RJ. Adult and in utero exposure to cocaine alters sensitivity to the parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience*. 2006;137(3):905–13 [cited 2018 Aug 15] Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030645220501095X>.
7. Curtin K, Fleckenstein AE, Robison RJ, Crookston MJ, Smith KR, Hanson GR. Methamphetamine/amphetamine abuse and risk of Parkinson's disease in Utah: a population-based assessment. *Drug Alcohol Depend*. 2015;146:30–8 [cited 2018 Aug 15] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25479916>.
8. Kakish J, Lee D, Lee JS. Drugs That Bind to α -Synuclein: Neuroprotective or Neurotoxic? *ACS Chem Neurosci*. 2015;6(12):1930–40 [cited 2018 Sep 23] Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acschemneuro.5b00172>.
9. Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAJ, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197–211 [cited 2018 Aug 15] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12498954>.
10. Qin Y, Ouyang Q, Pablo J, Mash DC. Cocaine abuse elevates alpha-synuclein and dopamine transporter levels in the human striatum. *Neuroreport*. 2005;16(13):1489–93 [cited 2018 Sep 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16110277>.
11. Lill CM. Genetics of Parkinson's disease. *Mol Cell Probes*. 2016;30(6):386–96.
12. Darcourt J, Booij J, Tatsch K, Varrone A, Vander Borght T, Kapucu ÖL, et al. EANM procedure guidelines for brain neurotransmission SPECT using 123I-labelled dopamine transporter ligands, version 2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010;37(2):443–50 [cited 2019 Jun 12] Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-009-1267-x>.
13. Bhatia KP, Bain P, Bajaj N, Elble RJ, Hallett M, Louis ED, et al. Consensus Statement on the classification of tremors. from the task force on tremor of the International Parkinson and Movement Disorder Society. *Mov Disord*. 2018;33(1):75–87 [cited 2018 Aug 17] Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/mds.27121>.
14. Kagi G, Bhatia KP, Tolosa E. The role of DAT-SPECT in movement disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2010;81(1):5–12 [cited 2019 Jun 16] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20019219>.
15. Varrone A, Dickson JC, Tossici-Bolt L, Sera T, Asenbaum S, Booij J, et al. European multicentre database of healthy controls for [123I]FP-CIT SPECT (ENC-DAT): age-related effects, gender differences and evaluation of different methods of analysis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2013;40(2):213–27 [cited 2019 Jun 12] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23160999>.
16. Zheng Y, Liu Y, Wu Q, Hong H, Zhou H, Chen J, et al. Confirmation of LRRK2 S1647T variant as a risk factor for Parkinson's disease in Southern China. *Eur J Neurol*. 2011;18(3):538–40 [cited 2018 Apr 2] Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1468-1331.2010.03164.x>.
17. Siciliano CA, Fordahl SC, Jones SR. Cocaine Self-Administration Produces Long-Lasting Alterations in Dopamine Transporter Responses to Cocaine. *J Neurosci*. 2016;36(30):7807–16 [cited 2019 Aug 24] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27466327>.
18. Büttner A. Review: The neuropathology of drug abuse. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2011;37(2):118–34 [cited 2018 Aug 15] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20946118>.
19. Malison RT, Best SE, van Dyck CH, McCance EF, Wallace EA, Laruelle M, et al. Elevated striatal dopamine transporters during acute cocaine abstinence as measured by [123I] beta-CIT SPECT. *Am J Psychiatry*. 1998;6(6):155, 832–4 [cited 2018 Sep 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9619159>.
20. Bauer LO. Resting hand tremor in abstinent cocaine-dependent, alcohol-dependent, and polydrug-dependent patients. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996;20(7):1196–201 [cited 2018 Aug 15] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8904970>.
21. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ, et al. Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse*. 1993;14(2):169–77 [cited 2018 Sep 23] Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/syn.890140210>.
22. Asser A, Taba P. Psychostimulants and movement disorders. *Front Neurol*. 2015;6:75 [cited 2018 Sep 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25941511>.
23. Sordo L, Indave BI, Barrio G, Degenhardt L, de la Fuente L, Bravo MJ. Cocaine use and risk of stroke: a systematic review. *Drug Alcohol Depend*. 2014;142:1–13 [cited 2018 Sep 23] Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0376871614009685>.
24. Bartzokis G, Beckson M, Lu PH, Edwards N, Rapoport R, Wiseman E, et al. Age-related brain volume reductions in amphetamine and cocaine addicts and normal controls: implications for addiction research. *Psychiatry Res*. 2000;98(2):93–102 [cited 2018 Sep 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10762735>.
25. Romero MJ, Asensio S, Palau C, Sanchez A, Romero FJ. Cocaine addiction: diffusion tensor imaging study of the inferior frontal and anterior cingulate white matter. *Psychiatry Res*. 2010;181(1):57–63 [cited 2018 Sep 23] Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925492709001693>.
26. Di Rocco A, Nasser S, Werner P. Inhaled Cocaine Used to Relieve "Off" Periods in Patients With Parkinson Disease and Unpredictable Motor Fluctuations. *J Clin Psychopharmacol*. 2006;26(6):689–90 [cited 2018 Sep 23] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110842>.
27. Callaghan RC, Cunningham JK, Sykes J, Kish SJ. Increased risk of Parkinson's disease in individuals hospitalized with conditions related to the use of methamphetamine or other amphetamine-type drugs. *Drug Alcohol Depend*. 2012;120(1–3):35–40 [cited 2018 Aug 15] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21794992>.
28. Lim TT, Ahmed A, Itin I, Gostkowski M, Rudolph J, Cooper S, et al. Is 6 Months of Neuroleptic Withdrawal Sufficient to Distinguish Drug-Induced Parkinsonism From Parkinson's Disease? *Int J Neurosci*. 2013;123(3):170–4 [cited 2019 Aug 25] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23078283>.
29. Erro R, Bhatia KP, Tinazzi M. Parkinsonism following neuroleptic exposure: A double-hit hypothesis? *Mov Disord*. 2015;30(6):780–5 [cited 2019 Aug 25] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25801826>.
30. Lin C-HH, Wu R-MM, Tai C-HH, Chen M-LL, Hu F-CC. Lrrk2 S1647T and BDNF V66M interact with environmental factors to increase risk of Parkinson's disease. *Park Relat Disord*. 2011;17(2):84–8 [cited 2019 May 24] Available from: <https://doi.org/10.1016/j.parkrel.2010.11.011>.
31. Peeraully T, Tan EK. Genetic variants in Sporadic Parkinson's Disease: East vs West. *Park Relat Disord*. 2012;18:S63–5 [cited 2019 May 24] Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22166457>.
32. Haberstick BC, Boardman JD, Wagner B, Smolen A, Hewitt JK, Killea-Jones LA, et al. Depression, Stressful Life Events, and the Impact of Variation in the Serotonin Transporter: Findings from the National Longitudinal Study of Adolescent to Adult Health (Add Health). *PLoS One*. 2016;11(3). [cited 2019 Jun 12] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4777542/>

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

