

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΓΚΟΥΡΜΠΑΛΗ Α. ΒΑΣΙΛΙΚΗ
ΙΑΤΡΟΣ - ΝΕΥΡΟΛΟΓΟΣ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΙΚΟΓΕΝΩΝ ΜΟΡΦΩΝ
ΝΟΣΟΥ PARKINSON ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

Στους γονείς μου, Στέργιο και Πόπη

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Χατζηγεωργίου Γεώργιος, *Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ (επιβλέπων)*
2. Παπαδημητρίου Αλέξανδρος, *Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ*
3. Τσέζου Ασπασία, *Αν. Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής ΠΘ*

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Γερμενής Αναστάσιος, *Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ*
2. Μαλίζος Κων/νος, *Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ*
3. Παπαδημητρίου Αλέξανδρος, *Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ*
4. Στεφανίδης Ιωάννης, *Αν. Καθηγητής Τμήματος ΠΘ*
5. Τσέζου Ασπασία, *Αν. Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής ΠΘ*
6. Χατζηγεωργίου Γεώργιος, *Αν. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ*
7. Πατεράκης Κων/νος, *Επικ. Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής ΠΘ*

«Η έγκρισις της διδακτορικής διατριβής υπό του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλοί αποδοχήν των γνωμών του συγγραφέα»

(Νόμος 5343/32, αρθρ. 202, παρ. 2 και Ν.1268/82, αρθρ. 50 παρ. 8)

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΗΝ
ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Screening for SNCA and LRRK2 mutations in Greek sporadic and
autosomal dominant Parkinson's disease : identification of two novel
LRRK2 variants**

Xiomerisiou G, Hadjigeorgiou GM, Gourbali V, Johnson J, Papakonstantinou
I, Papadimitriou A, Singleton AB

Eur J Neurol 2007 Jan;14(1):7-11

**Association between AKT1 gene and Parkinson's disease: A protective
haplotype**

Xiomerisiou G, Hadjigeorgiou GM, Papadimitriou A, Katsarogiannis E,
Gourbali V, Singleton AB

Neurosci Lett 2008 May 9;436(2)-4. Epub 2008 Mar 15

**Association of tau haplotype –tagging polymorphisms with Parkinson's
disease in diverse ethnic Parkinson's disease cohorts**

Fung HC, Xiomerisiou G, Gibbs JR, Wu YR, Eerola J, Gourbali V, Hellstrom
O, Duckworth J, Papadimitriou A, Tienari PJ, Hadjigeorgiou GM, Hardy J,
Singleton AB

Neurodegener Dis. 2006;3(6):327-33

**Testing association between LRRK2 and Parkinson's disease and
investigating linkage disequilibrium**

Paisan-Ruiz C, Evans EW, Jain S, Xiomerisiou G, Gibbs JR, Eerola J,
Gourbali V, Hellstrom O, Duckworth J, Papadimitriou A, Tienari PJ,
Hadjigeorgiou GM, Singleton AB

J Med Genet 2006 Feb;43(2):e9

**Association of alpha-synuclein Rep1 polymorphism and Parkinson's
disease: influence of Rep1 on age at onset.**

Hadjigeorgiou GM, Xiomerisiou G, Gourbali V, Aggelakis K, Scarmeas N,
Papadimitriou A, Singleton AB

Mov. Disord 2006 Apr; 21(4):534-9

**Lack of evidence for a genetic association between FGF20 and
Parkinson's disease in Finnish and Greek Patients**

Clarimon J, Xiromerisiou G, Eerola J, Gourbali V, Hellstrom O, Drdilotis E,
Peurallina T, Papadimitriou A, Hadjigeorgiou GM, Tienari PJ, Singleton AB
BMC Neurol 2005 Jun 20;5:11

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Τελειώνοντας τη διατριβή είναι απαραίτητο να ευχαριστήσω κάποιους ανθρώπους, χωρίς τη συμβολή των οποίων δε θα είχα καταφέρει να την ολοκληρώσω.

Αρχικά οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους καθηγητές μου κ. Αλέξανδρο Παπαδημητρίου και κ. Γιώργο Χατζηγεωργίου που διεύρηναν τους επιστημονικούς μου ορίζοντες και μου δώσανε την ευκαιρία να γνωρίσω μια άλλη πτυχή της νευρολογίας, τη νευρογενετική και να εργασθώ στο εργαστήριο Νευρογενετικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω επίσης, τις καθηγήτριες κα Τσέζου και κα Κόλλια, οι οποίες πάντα με διάθεση και υπομονή με βοηθούσαν να ξεπεράσω προβλήματα που συναντούσα στην διεκπεραίωση του εργαστηριακού τμήματος της διατριβής μου και να κατανοήσω τις μεθόδους και τις τεχνικές για την ολοκλήρωσή της.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στη συνάδελφο και φίλη Γεωργία Ξηρομερήσιου η οποία σε όλη αυτή την πορεία στάθηκε μια εξαιρετική συνεργάτης και μία πολύτιμη φίλη.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω: α) όλους τους συναδέλφους της Πανεπιστημιακής Νευρολογικής Κλινικής του Π.Γ.Ν.Λάρισας για την βοήθεια τους στην συλλογή των κλινικών και δημογραφικών στοιχείων της μελέτης και β) όλους τους ασθενείς και τις οικογένειες τους για την αποδοχή συμμετοχής στη μελέτη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η νόσος του Parkinson είναι μια νευροεκφυλιστική ασθένεια που προσβάλλει το 1-2% του πληθυσμού άνω των 65 χρόνων. Η παθοφυσιολογία της νόσου χαρακτηρίζεται από σταδιακή και βαρεία εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων της μέλαινας ουσίας με παρουσία ηωσινοφιλικών, ενδοκυτταροπλασματικών, πρωτεϊνικών εγκλείστων τα οποία ορίζονται ως σωμάτια Lewy.

Οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου περιλαμβάνουν κινητικές διαταραχές που χαρακτηρίζονται από τρόμο ηρεμίας, βραδυκίνηση, διαταραχές στάσης και υπερτονία, καθώς και μη κινητικά συμπτώματα όπως διαταραχές του αυτονόμου, γνωσιακή έκπτωση και ψυχιατρικά προβλήματα.

Τα μοριακά μονοπάτια που οδηγούν σε αυτές τις παθοφυσιολογικές ανωμαλίες και ακολούθως στην εμφάνιση των κλινικών εκδηλώσεων της νόσου του Parkinson δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Οι αλλαγές αυτές πιστεύεται ότι μπορεί να είναι απότοκες περιβαλλοντικών παραγόντων, γενετικών παραγόντων ή συνδιασμού και των δύο. Επιδημιολογικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι λιγότερο από το 10% των περιπτώσεων νόσου έχουν οικογενή χαρακτήρα, ενώ η πλειοψηφία των περιπτώσεων έχει σποραδικό χαρακτήρα. Ποικίλοι γενετικοί επίτοποι έχουν ταυτοποιηθεί για τη νόσο Parkinson. Ωστόσο για πέντε από αυτούς είναι σαφής η εμπλοκή τους στην εμφάνιση οικογενούς μορφής της νόσου (PARK 1, 2, 6, 7 και 8)

Μεταλλάξεις στα γονίδια της SNCA και της LRRK2, τα οποία αντίστοιχα κωδικοποιούν την α-συνουκλείνη και την leucine-rich repeat kinase 2, προκαλούν αυτοσωμική επικρατή οικογενή μορφή της νόσου Parkinson (AdPD). Μελετήθηκαν 55 ασθενείς με αυτοσωμική επικρατή οικογενή μορφή της νόσου Parkinson και αντίστοιχος αριθμός υγιών μαρτύρων τις ίδιες ηλικίας και φύλου, όλοι Ελληνικής καταγωγής για μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά. Ο έλεγχος έγινε με προσδιορισμό της πρωτοταγούς ακολουθίας του DNA (sequencing) για τα δύο αυτά γονίδια. Επίσης για τους ίδιους ασθενείς πραγματοποιήθηκε ανάλυση «δόσης γονιδίου» (gene dosage analysis) του γονιδίου της α-συνουκλείνης με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της DNA

πολυμεράσης (Quantitative Polymerase Chain Reaction : PCR) του γονιδιακού DNA. Από τον γενόμενο έλεγχο δε βρέθηκαν παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις ή πολλαπλασιασμοί στο γονίδιο της α-συνουκλείνης. Βρέθηκαν όμως δύο νέες μεταλλάξεις στο γονίδιο της LRRK2 (A211V και K544E) σε δύο ασθενείς με αυτοσωμική επικρατή μορφή της νόσου. Οι μεταλλάξεις αυτές δεν αναγνωρίστηκαν στο γενετικό υλικό των υγείων μαρτύρων.

ABSTRACT

Parkinson's disease is a degenerative neurological illness affecting 1-2% of the population over 65 years old. The neuropathological hallmarks are characterized by progressive and profound loss of neuromelanin containing dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) with presence of eosinophilic, intracytoplasmic, proteinaceous inclusions termed as Lewy bodies.

Clinical features of Parkinson's disease include motor impairments involving resting tremor, bradykinesia, postural instability and rigidity along with non motoric symptoms like autonomic, cognitive and psychiatric problems.

The molecular pathways leading to this pathological picture and concomitant clinical syndromes are obscure, but it is believed that it may result from an environmental factor, a genetic causation or a combination of the two. Epidemiological studies reveal that <10% of Parkinson's disease has a strict familial etiology while majority of cases are sporadic. Several genetic loci are identified for Parkinson's disease. However, there are five clearly defined genetic causes of Parkinson's disease (PARK1, 2, 6, 7 and 8)

Mutations in SNCA and LRRK2 genes, encoding alpha synuclein and leucine-rich repeat kinase 2, respectively, cause autosomal dominant Parkinson's disease (AdPD). We studied 55 patients with AdPD and 55 age and gender matched controls all of Greek origin. Patients were screened for SNCA and LRRK2 mutations by direct sequencing. SNCA gene dosage analysis was also performed for AdPD using quantitative duplex polymerase chain reaction of genomic DNA. We found no missense mutations or multiplications in the SNCA gene. We report to novel variants, A211V and K544E in LRRK2 gene in two patients with AdPD that was not present in controls.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. ΓΕΝΙΚΑ

II. ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ PARKINSON

α. ΣΠΟΡΑΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ

β. ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗ – ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ PARKINSON

- PARK1 (α -Synuclein) PARK4

- PARK2 (parkin)

- PARK3

- PARK5

- PARK6 (PINK1)

- PARK7 (DJ-1)

- PARK8 (LRRK2)

- PARK9

- PARK10

- PARK11

- PARK12

- PARK13

- Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και οξειδωτική βλάβη στην παθογένεια της νόσου Parkinson

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΣΚΟΠΟΣ

II. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

β. ΜΕΘΟΔΟΙ

III. ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

VI. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- SNCA

- LRRK2 G2019S variant

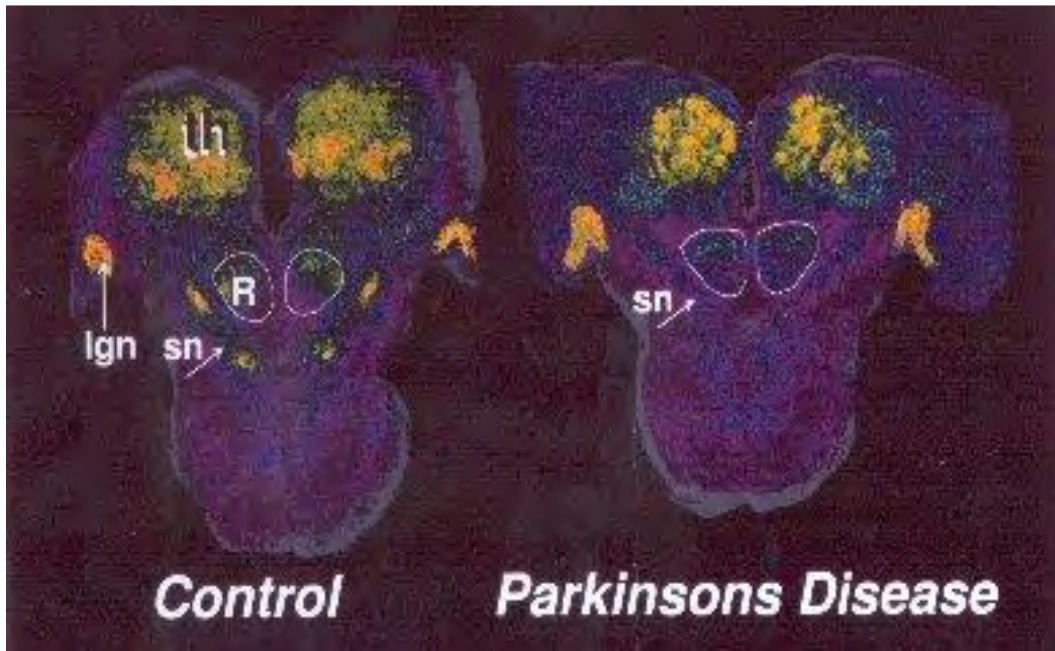
- LRRK2 K544E variant

- LRRK2 A211V variant

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

A . ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. ΓΕΝΙΚΑ



Η νόσος του Parkinson περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1817 από τον άγγλο ιατρό James Parkinson. Πρόκειται για μία χρόνια προοδευτική νευροεκφυλιστική νόσος, που χαρακτηρίζεται από επιλεκτική απώλεια των μελαινοραβδωτών ντοπαμινεργικών υποδοχέων.

Η κλινική εκδήλωση της νόσου περιγράφεται από την τριάδα: τρόμος ηρεμίας, βραδυκινησία και δυσκινησία. Υπολογίζεται ότι επηρεάζει περί το 1-2% του πληθυσμού, ηλικίας άνω των 65 ετών, ωστόσο στη μία από τις δέκα περιπτώσεις εμφανίζεται πριν από την ηλικία των 40 ετών. Σχεδόν το 10% των ασθενών με νόσο Parkinson έχει ένα συγγενή πρώτου βαθμού που πάσχει επίσης. Λαμβάνοντας υπ'όψιν τη συχνότητα της νόσου, η πιθανότητα τυχαίας εμφάνισής της, στην ίδια οικογένεια μπορεί να φτάσει και το 5%.

Σήμερα η θεραπευτική προσέγγιση της νόσου Parkinson, στοχεύει στην ανακούφιση από τα συμπτώματα και όχι στην παύση του θανάτου των ντοπαμινεργικών νευρώνων, γεγονός που οφείλεται στο ότι η παθογένειά της δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Πιστεύεται ότι πρόκειται για μία πολυπαραγοντική νόσο για την οποία και έχουν ενοχοποιηθεί τόσο περιβαλλοντικοί όσο και γενετικοί παράγοντες.

Η πλειοψηφία των ασθενών με νόσο Parkinson έχουν σποραδική μορφή, ωστόσο η ανακάλυψη γονιδίων που συνδέονται με οικογενείς μορφές της νόσου (π.χ. *a-synuclein*, *parkin*, *DJ-1*, *PINK-1*, *LRRK2*), έχουν επιβεβαιώσει την εμπλοκή γενετικών παραγόντων στην παθογένεια της νόσου και θέτουν νέους θεραπευτικούς στόχους [1].

II. ΜΟΡΦΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ PARKINSON

α. ΣΠΟΡΑΔΙΚΗ ΜΟΡΦΗ

Η αιτιοπαθογένεια της νόσου Parkinson είναι εν πολλοίς άγνωστη. Πολλές θεωρίες προσπάθησαν να απαντήσουν στο ερώτημα «τι προκαλεί τη νόσο;», το θέμα αυτό όμως δεν έχει αποσαφηνιστεί.

Η ιδιοπαθής νόσος Parkinson εμφανίζεται σε όλες τις χώρες, όλες τις εθνότητες και όλες τις κοινωνικοοικονομικές τάξεις. Ο επιπολασμός της νόσου ανέρχεται, σε ηλικία 60-69 ετών σε περίπου 300 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού, ενώ σε ηλικία 70-79 ετών σε 3200 περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμού. Ο επιπολασμός στους μαύρους έγχρωμους είναι μόνο το 1/4 του επιπολασμού των λευκών, ενώ αντίστοιχα στους ασιάτες είναι το 1/3-1/2 [2].

Η σποραδική μορφή της νόσου θεωρείται πολυπαραγοντική. Έχουν ενοχοποιηθεί τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί παράγοντες (έκθεση σε τοξικούς παράγοντες, φάρμακα και ζιζανιοκτόνα), οι οποίοι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και οδηγούν σε εκλεκτικό θάνατο των κυττάρων της μέλαινας ουσίας που περιέχουν ντοπαμίνη και εν συνεχεία στην κλινική εμφάνιση της νόσου [3, 4].

β. ΟΙΚΟΓΕΝΗΣ ΜΟΡΦΗ – ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΤΟΥ PARKINSON

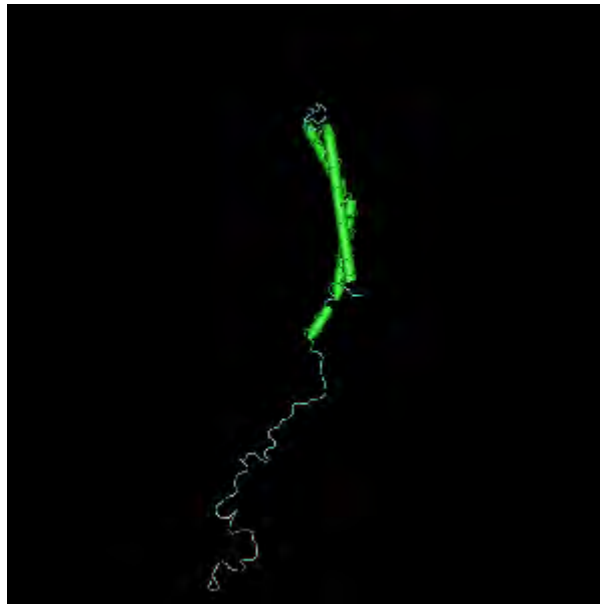
Η επίδραση γενετικών παραγόντων στην εμφάνιση της νόσου του Parkinson επιβεβαιώθηκε με την ταυτοποίηση γονιδιακών μεταλλάξεων υπευθύνων για οικογενείς μορφές της νόσου (Μενδελιανού τύπου κληρονομικότητα, αυτοσωμική επικρατής ή υπολειπόμενη). Δεκατρείς γενετικοί επίτοποι, έχει βρεθεί ότι ενέχονται στην εμφάνιση της νόσου Parkinson (πίνακας 1). Ωστόσο σαφώς, έχουν ενοχοποιηθεί για Μενδελιανού τύπου κληρονομικότητα στη νόσο πέντε γενετικοί επίτοποι , οι PARK1, 2, 6, 7, και 8.[5]

Στη συνέχεια θα γίνει περιληπτική αναφορά των μέχρι σήμερα γνωστών δεδομένων που αφορούν τα γονίδια που εμπλέκονται στην παθογένεια των κληρονομικών μορφών της νόσου Parkinson. Ιδιαίτερη αναφορά θα γίνει στα γονίδια της SNCA και της LRRK2, τα οποία αποτελούν το αντικείμενο της παρούσης μελέτης.

Πίνακας 1 . Γενετικοί επίτοποι που έχουν ενοχοποιηθεί για την παθογένεια της νόσου Parkinson

ΕΠΙΤΟΠΟΣ	ΓΟΝΙΔΙΟ	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ	ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ
PARK1	A-Synuclein	4q21	AD
PARK2	Parkin	6q25.2-27	AR
PARK3	Unknown	2p13	AD
PARK4	A-Synuclein locus triplication- duplication	4p15	AD
PARK5	UCH-L1	4p14	AD
PARK6	PINK1	1p35-36	AR
PARK7	DJ-1	1p36	AR
PARK8	LRRK2	12p11.2	AD
PARK9	ATP13A2	1p36	AR
PARK10	Unknown	1p32	AD
PARK11	Unknown	2q36-37	AD
PARK12	Unknown	Xq21-q25	Unknown
PARK13	HTRA2	2p12	Unknown

-PARK1 και PARK4 (α-Synuclein)



Οι συνουκλείνες είναι μικρές διαλυτές πρωτεΐνες που εκφράζονται κυρίως στο νευρικό ιστό και σε ορισμένους όγκους. Η οικογένεια περιλαμβάνει τρεις γνωστές πρωτεΐνες τις α-β και γ. Η α-συνουκλείνη και η β-συνουκλείνη, βρίσκονται κυρίως στον εγκεφαλικό ιστό, στις προσυναπτικές απολήξεις. Η γ-συνουκλείνη αρχικά εντοπίστηκε στο περιφερικό νευρικό σύστημα και στον αμφιβληστροειδή, αλλά η έκφρασή της και σε όγκους του μαστού, την καθιστά δείκτη για την εξέλιξη του όγκου.

Το γονίδιο της α-συνουκλείνης χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 4q21.3-q22, και είναι οργανωμένο σε 7 εξόνια, 5 από τα οποία κωδικοποιούν την πρωτεΐνη.

Η α-συνουκλείνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη 140 αμινοξέων, που εκφράζεται σε πολλά τμήματα του εγκεφάλου (κυρίως προσυναπτικά στις νευρικές απολήξεις) [6]. Δομικά η α-συνουκλείνη απαρτίζεται από μία αμινοτελική περιοχή, μία μεσαία υδροφοβική (η οποία περιέχει το μη αμυλοειδικό β συστατικό των πλακών που συναντώνται στη νόσο του Alzheimer NACP) και μία καρβοξυτελική περιοχή. Πιστεύεται ότι ενέχεται στη νευρομεταβίβαση και στη νευρωνική πλαστικότητα [7]. Όταν συμβαίνουν

μεταλλάξεις, παράγεται παθολογική πρωτεΐνη η οποία είναι δυσλειτουργική και εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου, προκαλώντας πιθανώς μία επιταχυνόμενη συσσώρευση αδιάλυτων ινιδίων [8]. Η α-συνουκλεΐνη αποτελεί ένα από τα κύρια συστατικά των σωματίων Lewy τόσο στην οικογενή όσο και στη σποραδική μορφή της νόσου Parkinson με πρώιμη έναρξη. Έχει παρατηρηθεί παθολογική συσσώρευση της πρωτεΐνης σε διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσους.

Το 1993, οι Ueda et al.[9] ανέφεραν ότι ένα μικρό πεπτίδιο (non amyloid component, NAC) που απομονώνεται από πλάκες αμυλοειδούς, οι οποίες ανευρίσκονται σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο Alzheimer, προέρχεται από μία μεγαλύτερη πρόδρομη πρωτεΐνη την NACP (non amyloid component precursor) η οποία είναι ταυτόσημη με την α-συνουκλεΐνη.

Το 1997, οι Polymeropoulos et al.[10] περιέγραψαν την πρώτη παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη (missence mutation) που συνδέθηκε με οικογενή μορφή της νόσου Parkinson με πρώιμη έναρξη που είχε ως αποτέλεσμα, την αντικατάσταση της αλανίνης στη θέση 53 με την θρεονίνη (A53T), στην μικρή προσυναπτική πρωτεΐνη, την α-συνουκλεΐνη (PARK1). Η μετάλλαξη αυτή ανιχνεύθηκε σε μία μεγάλη οικογένεια (Contursi) με καταγωγή από την νότια Ιταλία και 3 Ελληνικές οικογένειες από την Πελοπόννησο. Στη συνέχεια, το 1999, οι Papadimitriou et al. επιβεβαίωσαν την παρουσία της μετάλλαξης και σε άλλες Ελληνικές οικογένειες [11].

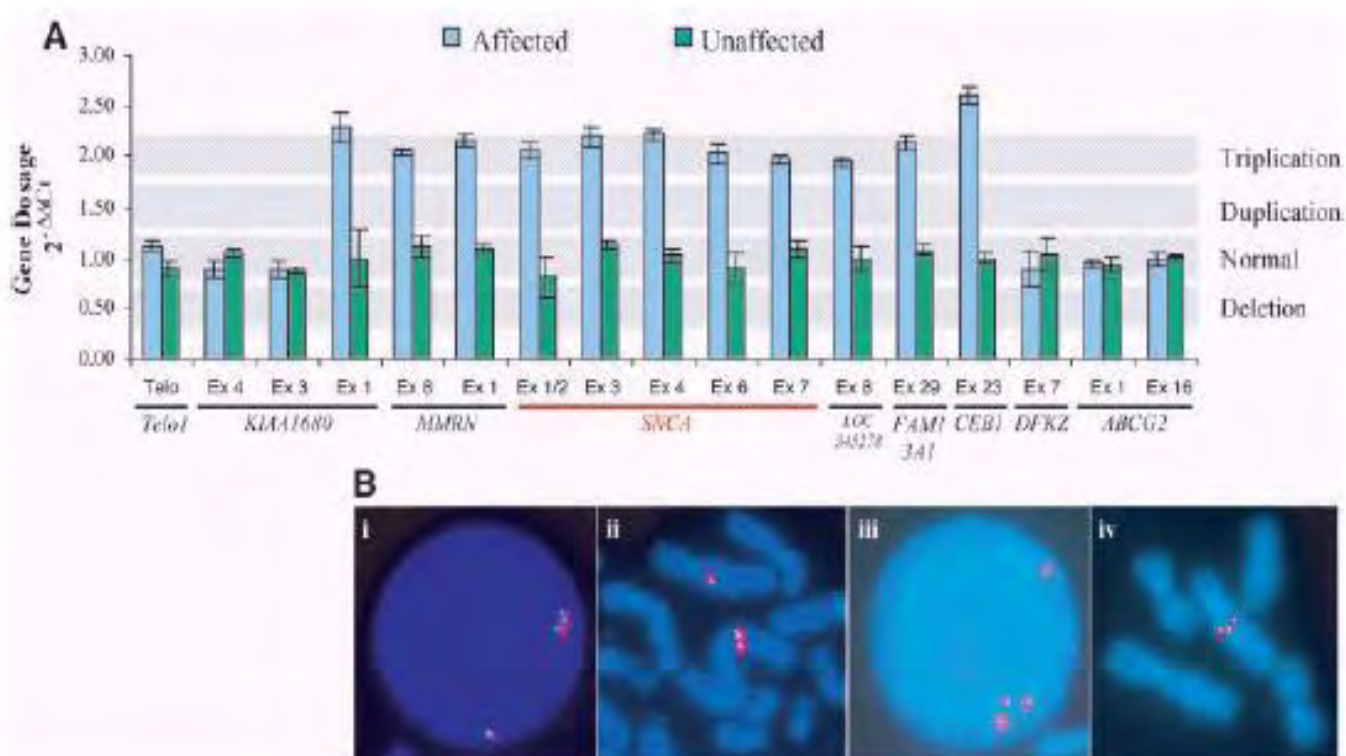
Την ίδια χρονιά οι Spillantini et al. [12] ταυτοποίησαν την α-συνουκλεΐνη ως βασικό συστατικό των σωματιδίων Lewy (Lewy bodies), των πρωτεϊνικών εγκλείστων που αποτελούν ιστολογικό δείκτη νευρωνικής εκφύλισης εγκεφαλικών περιοχών, ασθενών με νόσο Parkinson [13].

Έκτοτε έχουν γίνει μεγάλες προσπάθειες για να αποκαλυφθεί η νευροβιολογία – δράση - της α-συνουκλεΐνης και οι μηχανισμοί με τους οποίους οι εστιακές μεταλλάξεις (A53T, A30P, E46K) στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης [10, 14, 15] προκαλούν την εκφύλιση των ντοπαμινεργικών νευρώνων στη νόσο του Parkinson.

Το 2003 έγινε μεγάλη πρόοδος στην κατανόηση της νευροεκφυλιστικής διαδικασίας στη νόσο Parkinson από τους Singleton et al. [16]. Μελέτησαν μία μετάλλαξη τριπλασιασμού στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης σε μία μεγάλη

οικογένεια, μέλη της οποίας έπασχαν, από πρώιμης έναρξης νόσο Parkinson (PARK4). (Εικόνα1)

Αυτή η μελέτη για πρώτη φορά έκανε νύξη στο γεγονός ότι, αυξημένη έκφραση του άγριου τύπου (wild type) της α-συνουκλεΐνης μπορεί να αυξάνει τις πιθανότητες για εμφάνιση νόσου Parkinson και ότι το επίπεδο της α-συνουκλεΐνης μπορεί να καθορίζει την ηλικία έναρξης της νόσου. Το 2004 μελετήθηκαν οικογένειες με διπλασιασμό του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης και βρέθηκε ότι και αυτός ο τύπος μετάλλαξης μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση του φαινοτύπου της νόσου Parkinson [17, 18].



Εικόνα 1. A) Οικογένεια Iowa, gene dosage analysis των εξονίων της SNCA (quantitative real time-PCR) B) Fish analysis [α -synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease A.B.Singleton et al.]

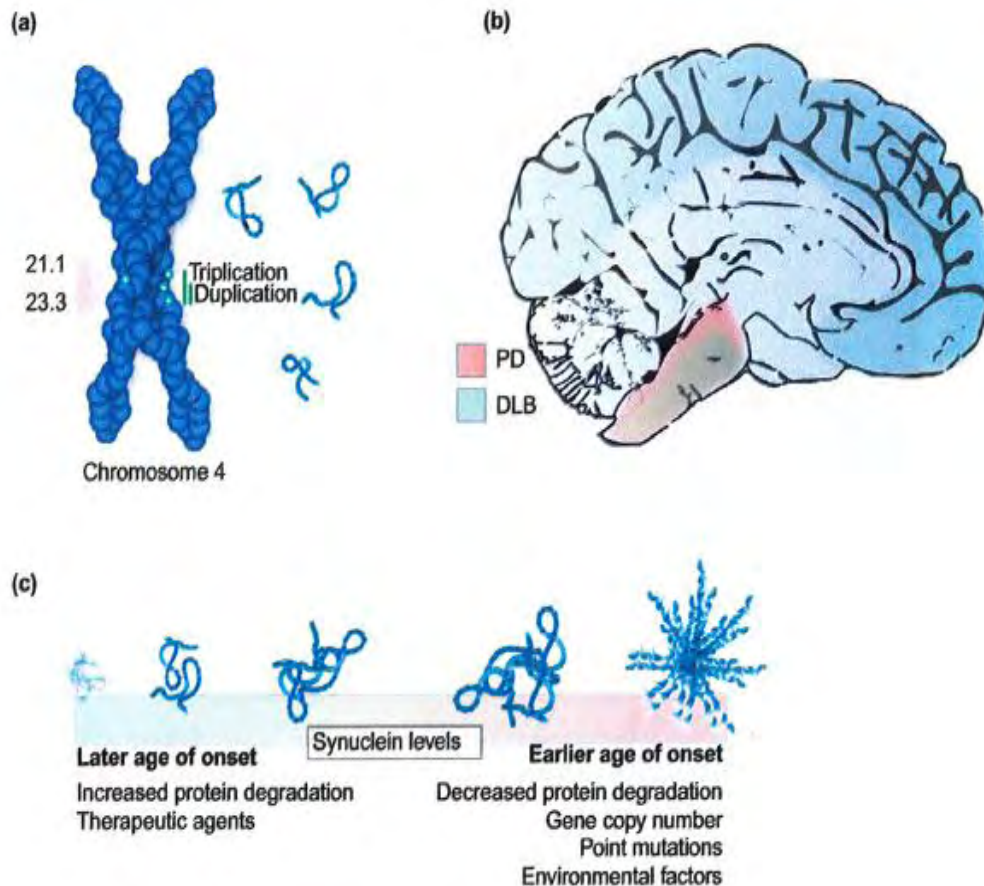
Αυτές οι δύο μελέτες πραγματεύονται το πώς τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης καθορίζουν τόσο την ηλικία έναρξης όσο και τη βαρύτητα της κλινικής εικόνας και αποδεικνύουν ότι και μικρές διακυμάνσεις στην έκφραση της α-συνουκλεΐνης, μπορούν να έχουν μεγάλη επίδραση στον φαινότυπο της

νόσου, όσο δε, υψηλότερα είναι τα επίπεδα έκφρασης της α-συνουκλεΐνης τόσο πιο βαρεία είναι η κλινική κατάσταση των ασθενών (πρώιμη έναρξη και ταχεία εξέλιξη). Η κλινική εικόνα των ασθενών που μελετήθηκαν (με οικογενή αυτοσωμική επικρατή μορφή της νόσου-AdPD), είναι παρόμοια με την κλινική εικόνα ασθενών με ιδιοπαθή μορφή της νόσου, με τη διαφορά ότι η ηλικία έναρξης είναι κοντά στα 45 έτη και η εξέλιξη είναι πιο ταχεία [11, 19]

Επιπλέον ασθενείς με τριπλασιασμό του γονιδίου είχαν επιπλέον κλινικές εκδηλώσεις, από τις κλασικές της νόσου Parkinson, όπως γνωσιακές διαταραχές, άνοια, ψευδαισθήσεις και σοβαρή δυσαυτονομία, καταστάσεις που υποδηλώνουν μία πιο εκτεταμένη νευροεκφυλιστική διαδικασία σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα α-συνουκλεΐνης. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν τις μελέτες που δείχνουν ότι η γενετική ποικιλομορφία στον υποκινητή του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης που οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου είναι παράγοντας κινδύνου για τη σποραδική μορφή της νόσου [20, 21] (Εικόνα2)

Δεδομένου ότι τώρα γνωρίζουμε πως ο ποσοτικός βαθμός έκφρασης του γονιδίου επηρεάζει σοβαρά την εμφάνιση της νόσου του Parkinson, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε το πώς ρυθμίζονται ενδοκυτταρικά τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης και το αν η μείωση των επιπέδων αυτής της πρωτεΐνης μπορεί να έχει επιβλαβή δράση στη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος.

Οι Cuervo et al. [22] ταυτοποίησαν την α-συνουκλεΐνη ως υπόστρωμα του chaperon-mediated autophagy (CMA), ενός μηχανισμού που θεωρείται υπεύθυνος για την αποδόμηση του ενός τρίτου, περίπου, των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Η λυσοσωμιακή πρωτεϊνική αποδόμηση ενεργοποιείται σε συνθήκες κυτταρικού stress. Ουσίες που αποδομούνται μέσω αυτής της οδού περιέχουν τμήμα που αναγνωρίζει το λυσόσωμα, που εκλεκτικά αναγνωρίζεται από ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο(chaperone complex) που περιέχει hsc70.



Εικόνα 2 α) Διπλασιασμός και τριπλασιασμός (Οικογένεια Iowa) στο γονίδιο της SNCA. Οι ασθενείς με τέσσερα αντίγραφα του γονιδίου είχαν πολύ πρώιμη έναρξη, κεραυνοβόλο μορφή της νόσου και άνοια με σωμάτια Lewy(DLB), συχνά παρουσίαζαν δυσσαυτονομία διαταραχές ύπνου και διάθεσης. Αντιθέτως οι ασθενείς με διπλασιασμό του γονιδίου, είχαν κλινική εικόνα παρόμοια με την ιδιοπαθή μορφή της νόσου, χωρίς νοητική έκπτωση και άνοια. β) Στην ιδιοπαθή μορφή της νόσου Parkinson η πρώιμη εκφύλιση περιορίζεται μόνο στον διεγκέφαλο, ενώ σε κεραυνοβόλες μορφές PD και DLB οι βλάβες εκτείνονται και σε φλοιικές δομές. γ) Αυξημένα επίπεδα α-συνουκλείνης οδηγούν σε μορφές PD με πρωιμότερη έναρξη και βαρύτερη κλινική εικόνα και μπορεί να επηρεαστούν από περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Παράγοντες που έχουν αντίκτυπο στην ποιότητα της πρωτεΐνης και επηρεάζουν την αποδόμησή της, μπορούν δυνητικά να τροποποιήσουν την πρωτεϊνική συσσώρευση

Στο CMA, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο (chaperone complex) συνδέεται στο πρωτεϊνικό υπόστρωμα και το σύμπλεγμά τους στοχεύει τη λυσοσωμιακή μεμβράνη, πάνω στην οποία προσκολλάται μετά από ένωσή του με μία λυσοσωμιακή μεμβρανική πρωτεΐνη την Lamp2a, η οποία δρα ως υποδοχέας για αυτή την οδό.

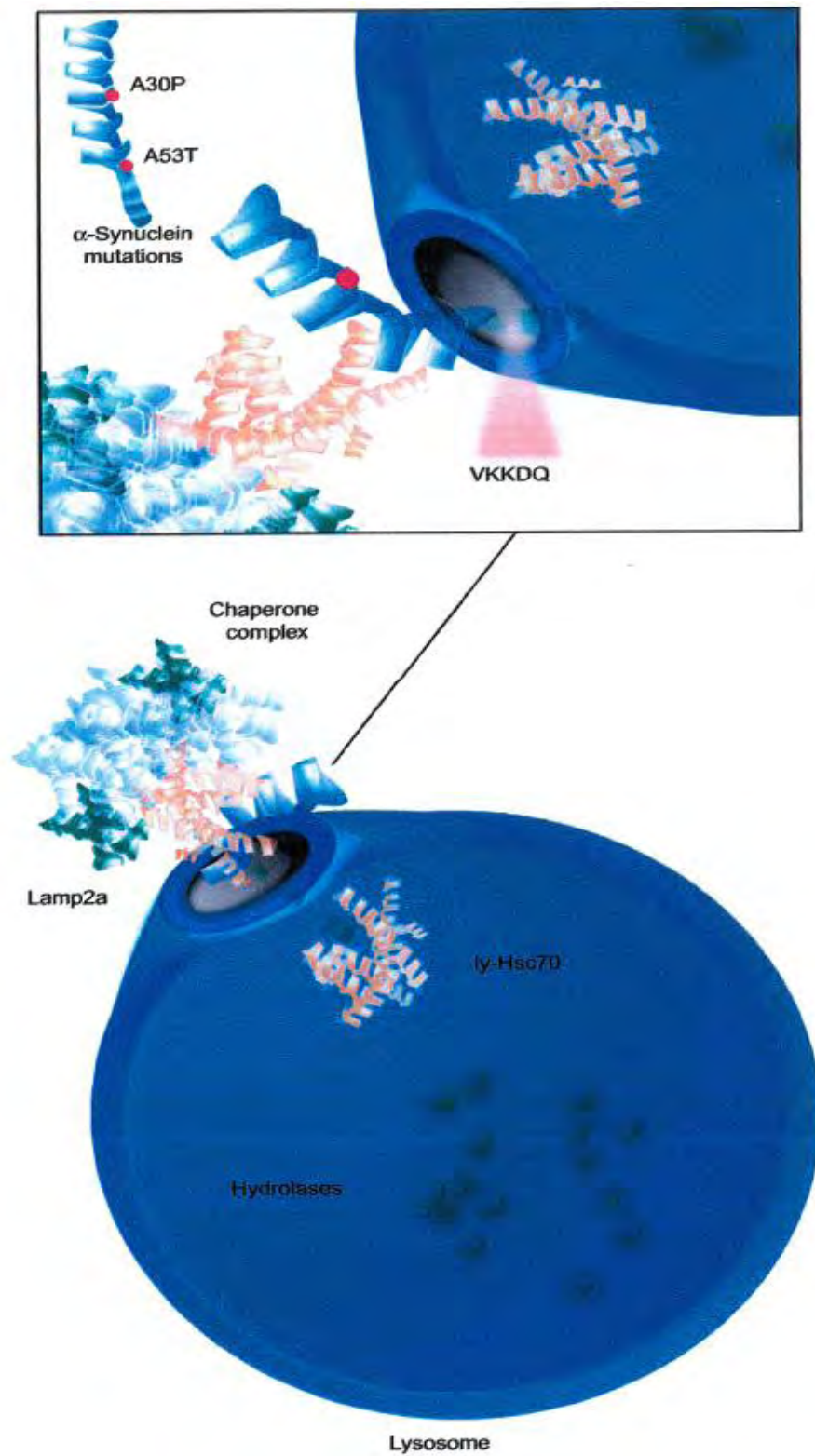
Ένα δεύτερο πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το λυσοσωμιακό hsc70, είναι απαραίτητο για την μεταφορά της προς αποδόμηση πρωτεΐνης μέσα στο λυσόσωμα. Η ανθρώπινη α-συνουκλεΐνη περιέχει μία αλληλουχία από 5 πεπτίδια (95WKKDQ99) που αντιστοιχεί σε τμήμα αναγνώρισης του CMA. (Εικόνα3)

Οι Chandra et al. [23] μελέτησαν τη φυσιολογική λειτουργία της α-συνουκλεΐνης και κατέληξαν στο συμπέρασμα πως είναι απαραίτητη για τη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων ντοπαμίνης στο μελαινοραβδωτό σύστημα.

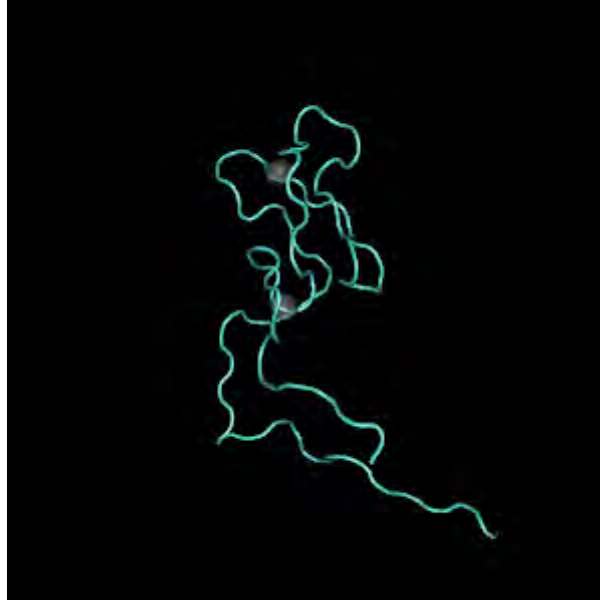
Αξίζει να αναφερθεί ότι μεταβολές στην ποιότητα της α-συνουκλεΐνης, όπως π.χ. οξειδωση της πρωτεΐνης, μπορεί δυνητικά να προκαλέσουν τη συσσώρευσή της και συνεπώς να συμβάλλουν στην εμφάνιση της νόσου Parkinson [13]

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης, αποτελούν σπάνια αιτία της νόσου Parkinson και έχουν αποκλεισθεί σε μεγάλες ομάδες ασθενών με σποραδική ή οικογενή μορφή της νόσου [24-30]. Ωστόσο η μετάλλαξη που βρέθηκε στην οικογένεια των Contursi στη νότια Ιταλία, ταυτοποιήθηκε και σε ελληνικές οικογένειες [10, 11]. Τρεις παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missence mutations) στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης: A53T [11], A30P [14], E46K [15], και ο τριπλασιασμός του γονιδίου [16] σχετίζονται με την εμφάνιση της επικρατούς αυτοσωμικής κληρονομούμενης μορφής της νόσου του Parkinson.

Εικόνα 3



- PARK2 (parkin)



Η μορφή της νόσου που σχετίζεται με το γονίδιο για την parkin χαρακτηρίζεται από αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο μενδελιανής κληρονομικότητας, με πρώιμη έναρξη. Η κλινική εικόνα αυτής της μορφής της νόσου περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Yamamura et al το 1973. Η συνήθης ηλικία έναρξης κυμαίνεται από 20 έως 40 χρόνων, αλλά μπορεί να εμφανισθεί και πριν από την ηλικία των 10 (σπανίως) ή και μετά την ηλικία των 60.

Σε νόσο με πρώιμη έναρξη, οι δυστονικές εκδηλώσεις και η βελτίωση της κλινικής εικόνας μετά την ξεκούραση ή τον ύπνο είναι χαρακτηριστικές. Οι ασθενείς ανταποκρίνονται καλά στη θεραπεία με L-Dopa, ωστόσο σύντομα παρουσιάζουν διακυμάνσεις ως προς την ανταπόκριση στην αγωγή και κινητικές διαταραχές.

Παθολογοανατομικά, η μέλαινα ουσία υφίσταται μεγάλη απώλεια νευρώνων και γλοΐωση. Συνήθως στη νόσο Parkinson που σχετίζεται με το γονίδιο της parkin δεν ανευρίσκονται σωμάτια Lewy [31, 32], παρότι έχουν αναφερθεί ολιγάριθμες περιπτώσεις στις οποίες αυτά υπάρχουν [33].

Πάνω από 100 διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν περιγραφεί για το γονίδιο της parkin [34-39]. Έχουν αναφερθεί απώλειες/απαλείψεις (deletions) εξονίων, αλλά επίσης παρερμηνεύσιμες (missence) και ανερμήνευτες (nonsense) μεταλλάξεις καθώς και πολλαπλασιασμοί (multiplications) εξονίων.

Το γονίδιο της parkin κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που αποτελείται από 465 αμινοξέα. Περιλαμβάνει ένα αμινοτελικό ουβικιτινωμένο άκρο, μία κεντρική συνδετική-linker περιοχή και μία καρβοξυτελική δακτυλιοειδή περιοχή.

Η parkin λειτουργεί σαν μία E3 ubiquitin λιγκάση παρόμοια με άλλες πρωτεΐνες που περιέχουν δακτυλιοειδή μοτίβα (RING fingers motifs), στοχεύοντας ανώμαλες πρωτεΐνες και οδηγώντας τις στην πρωτεασωματική οδό της ουβικουΐτίνης για αποδόμηση. Η parkin λειτουργεί σαν μία πολυδύναμη νευροπροστατευτική πρωτεΐνη, απέναντι σε μία πληθώρα τοξικών απειλών για την επιβίωση του ντοπαμινεργικού νευρώνα [40-43]. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της parkin και η σύνθεση παθολογικών πρωτεϊνών, οδηγεί στην εμφάνιση νόσου Parkinson, υπολειπόμενου αυτοσωμικού τύπου, πρώιμης έναρξης.

-PARK3

Η νόσος Parkinson που συνδέεται με τον γενετικό επίτοπο PARK3 κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και κλινικά εμφανίζεται με χαρακτήρες παρόμοιους με αυτούς της σποραδικής μορφής της νόσου, με ηλικία έναρξης από 36-89 χρόνων. Για τον επίτοπο αυτό δεν εντοπίστηκε ακόμη το υπεύθυνο γονίδιο, μεταλλάξεις στο οποίο οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου [44].

-PARK5

Η νόσος Parkinson που συνδέεται με τον γενετικό επίτοπο PARK5 κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα και έχει αναφερθεί μόνο μία οικογένεια [45]. Κλινικά εμφανίζεται με χαρακτήρες παρόμοιους με αυτούς της σποραδικής μορφής της νόσου, με ηλικία έναρξης από 49-50 ετών. Το γονίδιο της νόσου αναφέρεται ως ουβικουϊτίνη καρβοξυτελική υδρολάση L1-Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase-L1/UCH-L1. Στα προσβεβλημένα μέλη βρέθηκε η παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη: Ile93Met. Η UCH-L1 είναι πρωτεΐνη που σπάει τον καρβοξυτελικό πεπτιδικό δεσμό των αλυσίδων πολυουβικουϊτίνης. Η καταλυτική ιδιότητα /δράση της πρωτεΐνης που φέρει τη μετάλλαξη Ile93Met είναι κατά το ήμισυ περιορισμένη συνεπώς με αυτή τη μετάλλαξη μπορεί να μειώνεται η προσφορά ουβικουϊτίνης στο 26S πρωτεόσωμα.[45]

-PARK6 (PINK1)

Η μορφή της νόσου Parkinson που συνδέεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο της PINK1 είναι μία ακόμα υπολειπόμενη αυτοσωμική μορφή της νόσου με πρώιμη έναρξη. Η ηλικία εμφάνισης είναι λίγο πιο μεγάλη από αυτή στη νόσο που συνδέεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο της PARK2, εκτείνεται δε, από τα 32 έως τα 48 έτη [46, 47]. Δυστονικές εκδηλώσεις και βελτίωση μετά την ξεκούραση ή τον ύπνο δεν παρατηρούνται. Οι ασθενείς ανταποκρίνονται στη χορήγηση L-Dopa.

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PINK1 (PTEN- induced kinase1 όπου PTEN: phosphatase with tensin homology) [46, 48]. Πρόκειται για μία πρωτεΐνη μιτοχονδριακής εντόπισης, που αποτελείται από 581 αμινοξέα και περιέχει μια αμινοτελική αλληλουχία που στοχεύει το μιτοχόνδριο και ένα τμήμα που λειτουργεί ως σερίνη/θρεονίνη πρωτεϊνική κινάση (domain serine/threonine protein kinase) [49]. Η λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμη, ωστόσο το γεγονός ότι εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και ότι ο μεγαλύτερος αριθμός μεταλλάξεων αφορούν στο τμήμα της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί στην κινάση ή κάποιο κοντινό σε αυτό πρωτεϊνικό τμήμα, υποδηλώνει κάποιο ρόλο στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, την πρωτεϊνική σταθερότητα και τις οδούς της παθογένειας της νόσου του Parkinson στις οποίες εμπλέκεται η κινάση [50, 51]. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο για την PINK1 είναι λιγότερο συχνές από ότι αυτές για την parkin και σε αυτές οφείλεται μόλις το 1-2% του συνόλου των περιπτώσεων νόσου Parkinson πρώιμης έναρξης [48, 52-54].

-PARK7 (DJ-1)



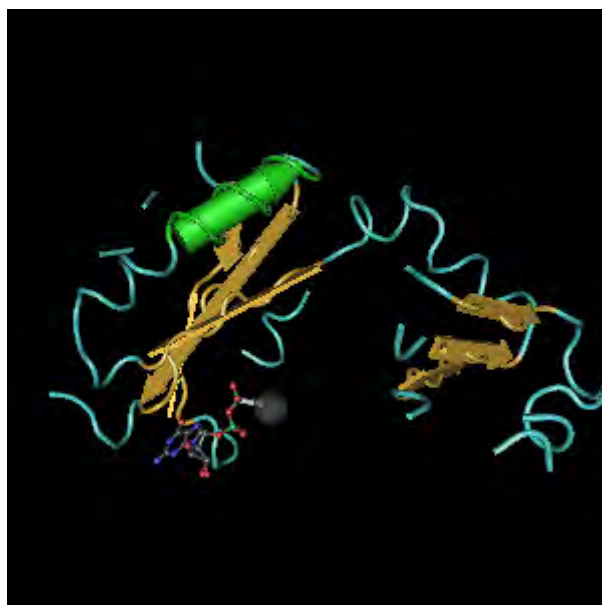
Η νόσος Parkinson που εμφανίζεται ως συνέπεια μετάλλαξης στο γονίδιο της DJ1 αποτελεί ακόμη μία μορφή της αυτοσωμικής υπολειπόμενης μορφής της νόσου με πρώιμη έναρξη. Οι κλινικές εκδηλώσεις είναι παρόμοιες με αυτές της νόσου που συνδέεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο PARK2 [55]. Η ηλικία έναρξης είναι συνήθως ανάμεσα στα 20 και στα 40 έτη. Έχουν αναφερθεί κάποιες άτυπες κλινικές εκδηλώσεις όπως ψυχιατρικά συμπτώματα (π.χ. κρίσεις άγχους) [56], χαμηλό ανάστημα και βραχυδακτυλία [57] .

Το γονίδιο αυτό ταυτοποιήθηκε από τους Bonifati et al. 2003 [58] και κλωνοποιήθηκε από τους Nagakubo et al. 1997 [59]. Το γονίδιο DJ1 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 189 αμινοξέων. Η ενεργός μορφή είναι ένα διμερές της μονομερούς DJ1. Πρόκειται για μία κυτταροπλασματική πρωτεΐνη η οποία όμως μπορεί να μεταφερθεί και στα μιτοχόνδρια [60, 61]. Η δράση της DJ1 και ο ρόλος που διαδραματίζει στην εκφύλιση του ντοπαμινεργικού νευρώνα δεν είναι γνωστά, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις που συνδέουν την DJ1 με το οξειδωτικό stress και τη μιτοχονδριακή λειτουργία. Οι Canet Aviles et al. [62]

έδειξαν ότι υπό οξειδωτικό stress, η DJ1, έχει έντονη αντιοξειδωτική δράση [59, 62-64].

Η εμφάνιση νόσου Parkinson που συνδέεται με την DJ1, είναι πολύ σπάνια [58, 65, 66]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο της DJ1 είναι υπεύθυνες για το 1-2% όλων των περιπτώσεων νόσου Parkinson με πρώιμη έναρξη [67]. Πρόκειται για μεταλλάξεις που περιλαμβάνουν αφαιρέσεις/απαλείψεις εξονίων (exonic deletions) και ομόζυγες ή ετερόζυγες γονιδιακές εστιακές μεταλλάξεις.

-PARK8 (LRRK2)

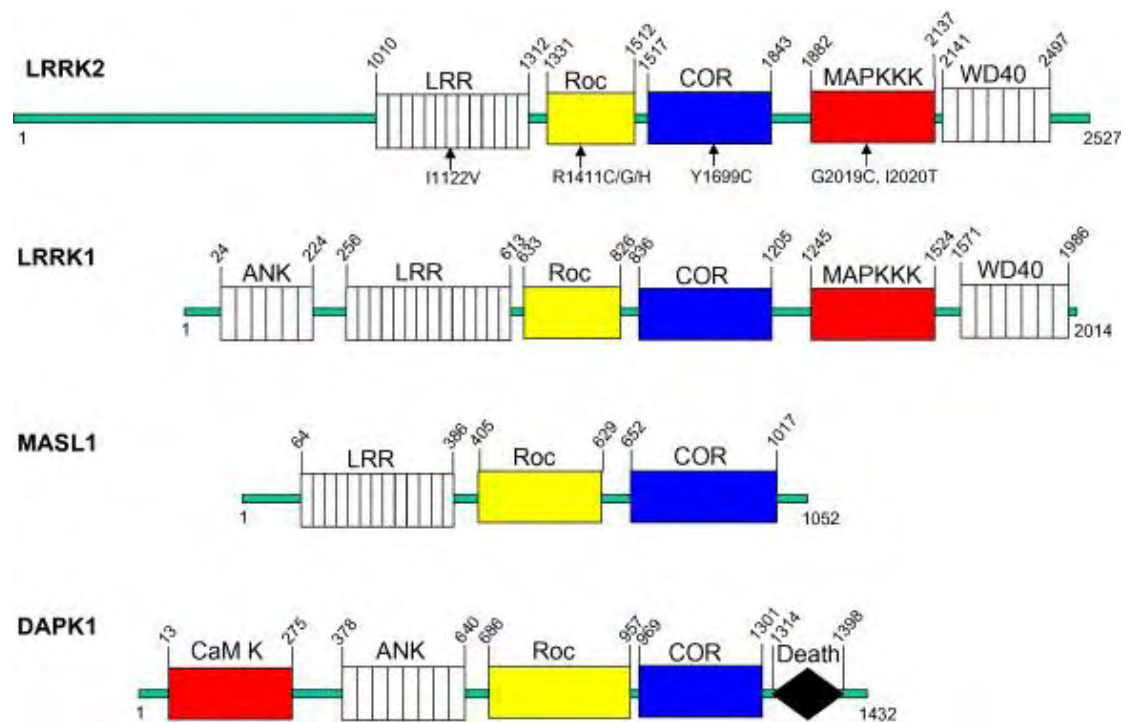


Η Leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2), επίσης γνωστή και ως δαρδαρίνη [68, 69], είναι μία μεγάλη πρωτεΐνη της οποίας η λειτουργία δεν είναι πλήρως καθορισμένη. Γνωρίζουμε ωστόσο ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση των διαδικασιών της μεταφοράς της νευρικής ώσης, μέσω της διπλής ενζυμικής της δράσης, αφενός ως GTP-ase, αφετέρου ως MAPKKK

(Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase). Ανήκει στην υπέρ-οικογένεια των ROCO. Ο όρος αυτός είναι σύνθετος, από τους όρους Roc και COR, χαρακτηρίζεται δε, από την παρουσία της Ras related GTPase ή Roc domain (Ras of complex proteins), η οποία ακολουθείται από ένα τομέα COR (C-terminal of Roc) [70]. Έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερα μέλη της οικογένειας των ROCO, η Leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2), η Leucine rich repeat kinase 1 (LRRK1), η malignant fibrous histiocytomas-amplified sequences with Leucine rich repeat repeats 1 (MASL1) και η death associated protein kinase 1 (DAPK1).

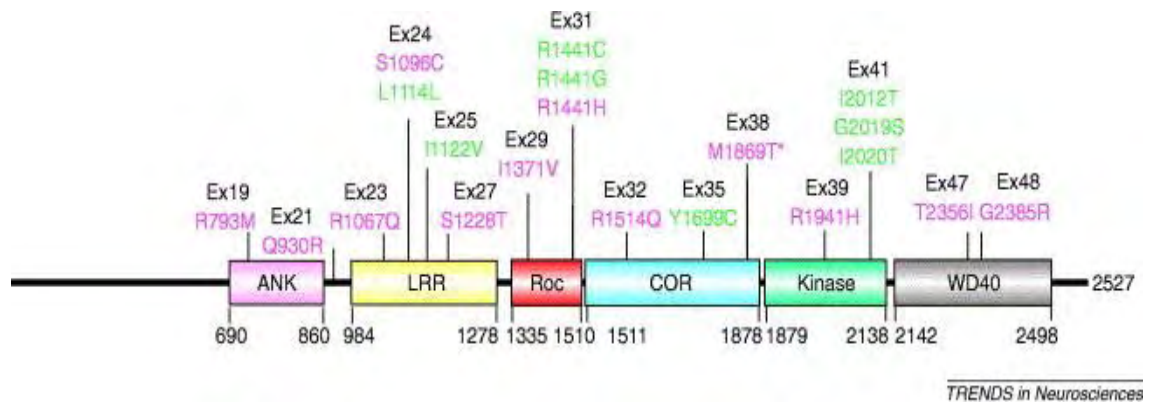
Έως τώρα θεωρείται ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο της LRRK2 αποτελούν το πιο συχνό αίτιο για την εμφάνιση τόσο της οικογενούς όσο και της ιδιοπαθούς μορφής της νόσου του Parkinson με καθυστερημένη έναρξη. Ποικίλες μεταλλάξεις συμβαίνουν είτε στο κομμάτι της πρωτεΐνης που έχει δράση GTPase, είτε σε αυτό που δρα ως κινάση. Τα τμήματα αυτά, αμφότερα, είναι ομόλογα με γνωστές πρωτεΐνες που λειτουργούν ως σημαντικοί ρυθμιστές στη μετάδοση του νευρικού σήματος. Πιστεύεται ότι η LRRK2 έχει πολλαπλές κυτταρικές λειτουργίες και συμμετέχει στη μεταφορά του νευρικού σήματος και στον κυτταρικό θάνατο στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.

Η LRRK2 πρωτεΐνη αποτελείται από 2527 αμινοξέα, τα οποία κωδικοποιούνται από 51 εξόνια στο γονίδιο της LRRK2, το οποίο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12q12 [71]. Δομικά όλες οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των ROCO πρωτεϊνών χαρακτηρίζονται από την παρουσία 200-500 αμινοξέων Roc (Ras of complex proteins) που τα ακολουθούν 300-400 αμινοξέα του COR τομέα (C-terminal of Roc). Τα Roc (Ras related small GTPase) και COR τμήματα των ROCO πρωτεϊνών συνήθως ακολουθούνται από μία κινάση που ανήκει στην υποοικογένεια MAPKKK (mitogen activated protein kinase kinase kinase). Αυτά τα δυνητικά λειτουργικά τμήματα χαρακτηρίζονται συχνά από επαναλήψεις αγκυρίνης και / ή λευκίνης στο αμινοτελικό άκρο, και WD40 (β propeller) επαναλήψεις στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι επαναλήψεις αυτές εμπλέκονται στην πρωτεϊνική αλληλεπίδραση. (Εικόνα4)



Εικόνα 4. Παρατίθεται η δομή των τεσσάρων ROCO ανθρώπινων πρωτεϊνών LRRK2, LRRK1, DAPK1 και MASL1.

Το μόριο της LRRK2 περιέχει 13 επαναλήψεις λευκίνης οι οποίες ακολουθούνται από τα πρωτεϊνικά τμήματα Roc, COR και MAPKKK και από 7 επαναλήψεις WD40. Τουλάχιστον επτά παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missence LRRK2 mutations) έχουν ταυτοποιηθεί στη νόσο του Parkinson: μία μέσα στο τμήμα των επαναλήψεων της Leucine rich (I1122V), τρεις μέσα στο τμήμα Roc/Ras –related GTPase (R1441C/G/H), μία στο τμήμα COR (Y1699C) και δύο στο τμήμα MAPKKK (G2019S και I2020T). (Εικόνα5)



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση των τμημάτων της LRRK2. Αναδεικνύεται το σημείο όπου υπάρχουν οι πιθανές παθογόνες μεταλλάξεις και η αντικατάσταση των αμινοξέων. Αυτές που συσχετίζονται με τη νόσο σημειώνονται με πράσινο και ο αριθμός του αντίστοιχου εξονίου σημειώνεται με μαύρο.

Ο ακριβής, φυσιολογικός ρόλος της LRRK2 δεν είναι γνωστός. Όμως το γεγονός ότι περιέχει πολλαπλούς λειτουργικούς τόπους, υποδηλώνει εμπλοκή της πρωτεΐνης σε μία πληθώρα κυτταρικών λειτουργιών. Η δράση της ως κινάση τεκμηριώθηκε πρόσφατα σε κυτταρική καλλιέργεια [72, 73]. Μέχρι τώρα μόνο για την LRRK1 έχει αποδειχθεί ότι το Roc τμήμα της έχει την ικανότητα να δεσμεύει GTP και στη συνέχεια να ενεργοποιεί τη δράση της πρωτεΐνης αυτής ως κινάση [74].

Το Roc τμήμα της LRRK2 είναι ομόλογο με τις τέσσερις ομάδες της υπεροικογένειας των Ras/GTPase. Οι ομάδες αυτές λειτουργούν ως μόρια διακόπτες στη ρύθμιση διαφόρων κυτταρικών μηχανισμών, όπως μιτογονική σηματοδότηση, μεταφορά κυστιδίων, επανοργάνωση του κυττοσκελετικού συστήματος και μεταφορά ουσιών από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Η ενεργοποίηση της Ras related GTPase απαιτεί μία υποχρεωτική μετατροπή του GDP- bound (δεσμού) σε GTP- bound. Η διαδικασία αυτή με τη σειρά της ελέγχεται από μία σειρά άλλων πρωτεϊνικών παραγόντων, ειδικών για κάθε κατηγορία των Ras related GTP-ases.

Το τμήμα MAPKKK της LRRK2 ανήκει σε μία ευρύτερη ομάδα πρωτεϊνικών κινάσεων. Το ενεργό κομμάτι της κινάσης εντοπίζεται σε ένα

τμήμα ενεργοποίησης το οποίο ξεκινά στο αμινοτελικό άκρο, με το τριπεπτίδιο DFG και καταλήγει στο καρβοξυτελικό άκρο με ένα άλλο τριπεπτίδιο το APE [75]. Συνήθως οι πρωτεϊνικές κινάσες βρίσκονται σε ανενεργή μορφή, μέχρι να συμβεί μία κριτική αλλαγή, στη δομή του τμήματός τους που ενέχεται στην ενεργοποίηση της δράσης τους. Η δομική αυτή αλλαγή συμβαίνει είτε με αυτοφοσφωρυλίωση, είτε με εξωγενή φωσφωρυλίωση από άλλες κινάσες, σε ορισμένες δε περιπτώσεις, με δέσμευση χωριστών ρυθμιστικών πρωτεϊνικών τμημάτων [75]. Στην LRRK2 που φέρει τη μετάλλαξη G2019S, έχουμε αντικατάσταση του G στο τριπεπτίδιο DYG στην αρχή του τμήματος ενεργοποίησης (ανάλογο με το DFG που προαναφέρθηκε). Μία ακόμη μετάλλαξη βρίσκεται στο ίδιο τμήμα, η I2020T. Οι μεταλλάξεις αυτές, με τις δομικές αλλαγές που επιφέρουν, φαίνεται να επηρεάζουν τη δράση της κινάσης αλλά οι ακριβείς μηχανισμοί δεν είναι ακόμη γνωστοί. Οι μεταλλάξεις στην LRRK2 που σχετίζονται με την εμφάνιση της νόσου Parkinson ενεργοποιούν τη δράση του μορίου ως κινάση, ως εκ τούτου οδηγούν στην εμφάνιση της νόσου [76]. Η άποψη αυτή ενισχύεται από μελέτες *in vitro*, που αποδεικνύουν ότι οι μεταλλάξεις G2019S και I2020T φαίνεται να ενισχύουν τη δράση της LRRK2 ως κινάση [72, 73].

Οι βιολογικοί μηχανισμοί που σημαίνονται από την MAP κινάση, είναι μηχανισμοί που ρυθμίζουν πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική αύξηση, η δομικές αλλαγές και η απόπτωση. Τόσο η Ras-related GTPase όσο και MAPKKK είναι σημαντικοί ρυθμιστές των μηχανισμών στους οποίους εμπλέκεται η MAP kinase και ένας από τους ενεργοποιητές (effectors) της Ras related GTPase είναι η MAPKKK. Η πρωτεΐνη αυτή ενεργοποιείται άμεσα από την Ras και στη συνέχεια αναμεταδίδει το εξωκυτταρικό σήμα από τον υποδοχέα, σε ένα καταρράκτη από κυττοσολικές κινάσες ενεργοποιώντας με φωσφωρυλίωση την MAPK/ERK kinase (MEK, MAPKK), η οποία φωσφωρυλώνει και ενεργοποιεί την MAPK, η οποία με τη σειρά της φωσφωρυλώνει κυττοσολικά και πυρηνικά υποστρώματα, καθιστώντας τα ενεργά για ποικίλες κυτταρικές λειτουργίες. Η παρουσία και των δύο τμημάτων, Ras related GTPase και MAPKKK στο μόριο της LRRK2 αυξάνει την πιθανότητα για αποτελεσματική διαμοριακή σηματοδότηση, στην οποία η περιοχή της GTPάσης ρυθμίζει απ'ευθείας τη δράση της κινάσης.

Είναι σαφές λοιπόν η σημασία αφενός, της μελλοντικής διευκρίνισης του ακριβούς ρόλου της Ras-related GTPase και της MAPKKK στο μόριο της LRRK2, αφετέρου της διάκρισης των ξεχωριστών, κατά τα φαινόμενα, ρόλων της κάθε μίας από αυτές, ή η διευκρίνιση των αλληλοεξαρτώμενων ρόλων τους στις φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες. Ο χαρακτηρισμός αυτών των λειτουργικών τμημάτων, των στόχων τους και των μορίων με τα οποία αλληλεπιδρούν θα βοηθήσει στον καθορισμό των ρυθμιστικών μηχανισμών στους οποίους συμμετέχει η LRRK2 και στο ρόλο που αυτή διαδραματίζει στη λειτουργία και στην επιβίωση των νευρώνων.

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της LRRK2 έχουν συγκεντρώσει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον γιατί θεωρείται ότι αποτελούν το πιο συχνό αίτιο της οικογενούς αυτοσωμικής επικρατούς μορφής. Τα ποσοστά κυμαίνονται από 42% των ασθενών με νόσο του Parkinson σε χώρες της Βόρειας Αφρικής έως πολύ χαμηλά ποσοστά (1.5-3%) σε μερικές ευρωπαϊκές χώρες, όπως η Ελλάδα [77-79]. Στις περιπτώσεις αυτές η κλινική εικόνα είναι παρόμοια με αυτή της σποραδικής νόσου, εκτός από το γεγονός ότι χαρακτηρίζεται από σχετικά νεότερη ηλικία έναρξης. Επίσης ανοϊκές εκδηλώσεις, αν και σπάνιες, έχουν αναφερθεί σε μεμονωμένες περιπτώσεις [80].

Πρόσφατα οι Hatano et al. 2007 [81] πραγματοποίησαν μία λεπτομερή παρατήρηση της ενδοκυτταρικής διάθεσης της LRRK2. Η πρωτεΐνη βρέθηκε στο σύστημα Golgi, στις μεμβράνες του πλάσματος, στα συναπτικά κυστίδια, και ειδικά στις λιπιδικές στοιβάδες (rafts). Αυτή η τελευταία εντόπιση, υποδηλώνει πιθανή εμπλοκή της LRRK2 στη μεταβίβαση του νευρικού σήματος, στη μεμβρανική διήθηση και στην κυταροσκελετική οργάνωση [82]. Οι Biskup et al. 2006 [83] αναφέρουν την παρουσία της LRRK2 σε μεμβρανικές δομές όπως λυσοσώματα, ενδοσώματα, μεταφορικά κυστίδια και στα μιτοχόνδρια.

-PARK9

Οικογενής μορφή νόσου Parkinson, με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας, συνδέεται με το γενετικό επίτοπο PARK9. Χαρακτηρίζεται από πρώιμη ηλικία έναρξης (11-16 έτη), ανταπόκριση στην L-Dopa, υπερπυρηνική οφθαλμική παράλυση, πυραμидικά σημεία και άνοια. Αυτή η μορφή της νόσου ονομάζεται και σύνδρομο Kufor-Rakeb από το όνομα της οικογένειας που παρατηρήθηκε για πρώτη φορά στην Ιορδανία [84].

Το γονίδιο της νόσου ταυτοποιήθηκε ως ATP13A2 [85] και κωδικοποιεί πρωτεΐνη της λυσοσωμικής μεμβράνης στην οποία βρίσκεται ένα τμήμα με δράση ATPάσης, χωρίς όμως να γνωρίζουμε σαφώς τη δράση της πρωτεΐνης αυτής. Σημαντικό είναι να παρατηρήσουμε ότι μεταλλάξεις σε μία πρωτεΐνη της λυσοσωμικής μεμβράνης μπορεί να προκαλέσουν με κάποιο τρόπο εκφύλιση της μέλαινας ουσίας και με αυτόν τον τρόπο υποδηλώνεται η σημασία των λυσοσωμάτων για τη διατήρηση της ακεραιότητας νευρώνων της μέλαινας ουσίας.

-PARK10

Οι Hicks et al. 2002 [86] μελέτησαν 51 οικογένειες στην Ισλανδία με περισσότερους από έναν ασθενή με νόσο Parkinson. Ο γενετικός επίτοπος PARK10 βρέθηκε με ευρεία σάρωση του γονιδιώματος (genome wide scanning), το δε γονίδιο της νόσου δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμη.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά είναι ουσιαστικά παρόμοια με αυτά της σποραδικής μορφής της νόσου με μέση ηλικία έναρξης τα 65.8 έτη.

-PARK11

Ο γενετικός αυτός επίτοπος, επίσης ανακαλύφθηκε με ευρεία σάρωση του γονιδιώματος. Οι Pankratz et al. 2003 [85,86], μελέτησαν 85 οικογένειες με ισχυρά οικογενές ιστορικό νόσου Parkinson και ανακάλυψαν ενδείξεις σύνδεσης με το μακρύ σκέλος του δεύτερου χρωμοσώματος (2q36-37). Η κλινική εικόνα είναι αυτή του σποραδικού τύπου της νόσου με μέσο όρο ηλικίας έναρξης τα 58 έτη.

-PARK12

Ο γενετικός αυτός επίτοπος, επίσης ανακαλύφθηκε με ευρεία σάρωση του γονιδιώματος στο σποραδικό τύπο της νόσου. Οι Pankratz et al. 2003 [87, 88] μελέτησαν 277 οικογένειες χωρίς ισχυρό οικογενές ιστορικό και ανακάλυψαν συσχέτιση με το μακρύ σκέλος του Χ χρωμοσώματος.

-PARK13

Οι Strauss et al. το 2005 [89] συσχέτισαν τη νόσο του Parkinson που συνδέεται με το γενετικό επίτοπο PARK13 με μετάλλαξη (G399S) στην Omi/HtrA2 (η μετάλλαξη αυτή βρέθηκε σε τέσσερις γερμανούς ασθενείς με σποραδική μορφή της νόσου).

Η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης οδηγεί σε μιτοχονδριακή δυσλειτουργία η οποία σχετίζεται με τροποποιημένη μιτοχονδριακή

μορφολογία. Επίσης, τα κύτταρα στα οποία υπέρ-εκφράζεται η μεταλλαγμένη μορφή της πρωτεΐνης είναι πιο ευάλωτα σε κυτταρικό θάνατο από stress. Ταυτοποίησαν επίσης και ένα καινούριο πολυμορφισμό, A141S, που συσχετίσθηκε με τη νόσο. Και οι δύο μεταλλάξεις πιστεύεται ότι οδηγούν σε πλημμελή ενεργοποίηση της δράσης της HtrA2/Omi ως πρωτεάση. Ωστόσο περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες πριν θεωρηθεί ότι πρόκειται για μία πρωτεΐνη που συνδέεται με την οικογενή μορφή της νόσου του Parkinson.

Οι HtrA (high temperature requirement A) είναι πρωτεάσες σερίνης και τα θηλαστικά κωδικοποιούν τέσσερις τύπους HtrA1-4. Η δράση ως πρωτεάση της HtrA2/Omi είναι απαραίτητη για την ομοιόσταση των μιτοχονδρίων και μεταλλάξεις που την απενεργοποιούν έχουν συνδεθεί με τη νόσο του Parkinson [90] .

-Μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και οξειδωτική βλάβη στην παθογένεια της νόσου Parkinson

Πιστεύεται ότι παράγοντες οι οποίοι άμεσα ή έμμεσα τροποποιούν τη φυσιολογική μιτοχονδριακή λειτουργία μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τη νευρωνική επιβίωση, επιβεβαιώνοντας έτσι την υπόθεση της εμπλοκής της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στην παθογένεια της νόσου Parkinson.

Το έλλειμμα του μιτοχονδριακού DNA στις υπομονάδες του μιτοχονδριακού συμπλέγματος I (complex I), η μειωμένη δραστηριότητα του μιτοχονδριακού συμπλέγματος I (complex I), στην αναπνευστική αλυσίδα των αιμοπεταλίων και στη μέλαινα ουσία των ασθενών με νόσο Parkinson, είναι ένα χαρακτηριστικό εύρημα [91, 92]. Μειωμένη δραστηριότητα του συμπλέγματος I παρατηρήθηκε επίσης σε υβριδικές κυτταρικές σειρές (cytoplasmic hybrid: cybrid) οι οποίες περιείχαν μιτοχονδριακό DNA ασθενών με νόσο Parkinson [93]. Επιδημιολογικές μελέτες αποκαλύπτουν ότι η έκθεση σε ζιζανιοκτόνα, βιομηχανικά απόβλητα και περιβαλλοντικές τοξίνες, εμπλέκεται στην παθογένεια της νόσου [94]. Παρομοίως με το MPTP και άλλοι αναστολείς του complex I (όπως η ροτενόνη) έχουν κεντρικό ρόλο στην μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και στην παθογένεια της νόσου Parkinson [95, 96]. Πρόσφατη ανατομοπαθολογική μελέτη σε εγκεφάλους ασθενών με νόσο Parkinson, έδειξε υψηλό ποσοστό ελλειμμάτων (deletions) στο μιτοχονδριακό DNA σε σύγκριση με ανατομοπαθολογικό υλικό από μύες, της αντίστοιχης ομάδας ελέγχου [97].

Οι ντοπαμινεργικοί νευρώνες της μέλαινας ουσίας βρίσκονται υπό συνεχές ισχυρό οξειδωτικό stress, πιθανώς λόγω της επανοξειδωτικής ανακύκλωσης των κατεχολαμινών, οδηγώντας σε αύξηση της παραγωγής επιβλαβών ελευθέρων ριζών οξυγόνου ROS (Reactive Oxygen Species). Μείωση των επιπέδων γλουταθειόνης στην μέλαινα ουσία σε προσυμπτωματική νόσο Parkinson υποδεικνύει ότι η οξειδωτική βλάβη συμβαίνει πριν από την νευρωνική απώλεια [98]. Ένδειξη της συσχέτισης της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας και του οξειδωτικού stress αποτελεί η ανεπάρκεια του μιτοχονδριακού συμπλέγματος I σε συνθήκες εξάντλησης των

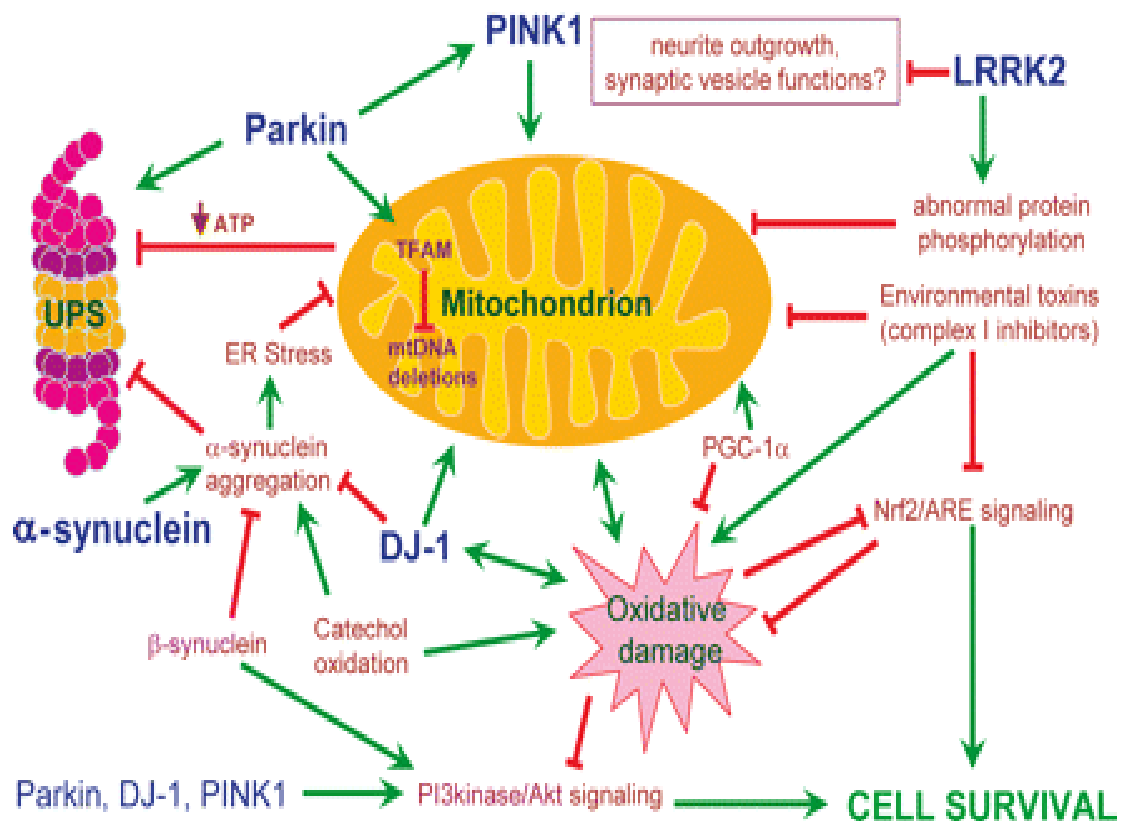
αποθεμάτων της αντιοξειδωτικής γλουταθειόνης [99]. Ο PGC-1 α (PPARgamma coactivator 1 alpha) εμπλέκεται στη βιογένεση των μιτοχονδρίων και στις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας και είναι ένας τροποποιητής της παραγωγής ROS κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες [100]. Σε πρόσφατη μελέτη αποδείχθηκε ότι ο PGC-1α είναι απαραίτητος για την επαγωγή πολλών ROS αντιοξειδωτικών ενζύμων. Σε πειραματόζωα με έλλειψη του PGC-1α βρέθηκε ότι οι ντοπαμινεργικοί υποδοχείς της μέλαινας ουσίας ήταν πιο ευάλωτοι στη νευροτοξική δράση του MPTP. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η υπέρ- έκφρασή του, προστάτεψε τους νευρώνες από θάνατο οφειλόμενο σε οξειδωτικό στρες, γεγονός που υποστηρίζει το ρόλο του PGC-1α ως ρυθμιστή του μεταβολισμού των ROS. Η ικανότητα του PGC-1α να αυξάνει τη δραστηριότητα της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων, τον καθιστά ικανό παράγοντα, στο να περιορίσει τη βλάβη που συνδέεται με μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και οξειδωτικό στρες που παρατηρείται σε νευροεκφυλιστικές νόσους μεταξύ των οποίων και η νόσος Parkinson, ενώ ταυτόχρονα ευοδώνει την αντιοξειδωτική δράση [101].

Ορισμένα γονίδια (α-synuclein, parkin, DJ-1, PINK και LRRK2) που σχετίζονται με την οικογενή μορφή της νόσου Parkinson, συνδέουν τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και το οξειδωτικό στρες με την παθογένεια της νόσου. Η α-συνουκλεΐνη, που αποτελεί βασικό συστατικό των σωματιδίων Lewy φαίνεται να συνδέει τη συσσώρευση παθολογικής πρωτεΐνης με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και το οξειδωτικό στρες. Σε ποντίκια στα οποία έχει προκληθεί υπερέκφραση α-συνουκλεΐνης, που φέρει τη μετάλλαξη A53T, ευοδώνεται η μιτοχονδριακή βλάβη, λόγω της συσσώρευσης της παθολογικής πρωτεΐνης [102]. Έχει αποδειχθεί ότι ποντίκια στα οποία λείπει η α-συνουκλεΐνη είναι πιο ανθεκτικά στη δράση ουσιών που είναι τοξικές για το μιτοχόνδριο όπως το MPTP και το 3-νιτροπροπιονικό οξύ, ενώ η υπερέκφραση ανθρώπινης α-συνουκλεΐνης σε ποντίκια τα κάνει πιο ευάλωτα σε τέτοιες ουσίες [103, 104].

Η δράση της Parkin, που είναι μία E3 ligase, φαίνεται να συσχετίζει το πρωτεασωματικό σύστημα της ουβικουΐτίνης τόσο με το οξειδωτικό στρες όσο και με τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η Parkin προλαμβάνει τη διόγκωση των μιτοχονδρίων, την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και την

ενεργοποίηση μιας κασπάσης, δράσεις οι οποίες καταργούνται όταν συμβαίνουν μεταλλάξεις της Parkin ή δρουν πρωτεασωματικοί αναστολείς [105]. Κατά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, η Parkin εγκαθίσταται στα μιτοχόνδρια, όπου συνεργάζεται με το TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A) και συνεπικουρεί στη βιογένεση των μιτοχονδρίων [106]. Οξειδωτικές και αμινοξικές τροποποιήσεις της parkin είτε μέσω μιας ντοπαμινικής είτε μέσω μιας S-αμινικής διαδικασίας έχουν ως αποτέλεσμα την επιδιόρθωση τη E3 ουβικουΐνη έτσι ώστε η parkin να μπορεί να δράσει προστατευτικά.[107, 108]

Μεταλλάξεις της DJ-1 συνδέουν την οικογενή μορφή της νόσου Parkinson, πρώιμης έναρξης, με το οξειδωτικό στρες και τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η ικανότητα της DJ-1 να λειτουργεί σαν αισθητήρας του οξειδωτικού στρες και σαν αντιοξειδωτικό ενισχύει αυτή την άποψη. Επιπλέον η ανεύρεση της, στα μιτοχόνδρια [61] και η υπερευαισθησία σε μιτοχονδριακές τοξίνες, όπως το MPTP, σε γενετικά μεταλλαγμένους ποντικούς, παρέχει ισχυρές ενδείξεις για το ρόλο της, στην νευροεκφύλιση μέσω του οξειδωτικού στρες και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας. Η μιτοχονδριακή κινάση PINK1 και η κυτοσολική κινάση LRRK2 έχουν επίσης έναν παθογενετικό ρόλο στη νευρωνική εκφύλιση που σχετίζεται με το μιτοχόνδριο.(Εικόνα 6)



Εικόνα 6. Γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια που υπογραμμίζουν την παθογένεια της νόσου Parkinson. [109] Τόσο περιβαλλοντικοί παράγοντες όσο και μεταλλάξεις στα γονίδια που έχουν συσχετιστεί με την οικογενή μορφή τα νόσου, όπως α-συνουκλεΐνη, parkin, DJ-1, PINK1 και LRRK2 έχουν συσχετιστεί με την παθογένεια της νόσου. Αυτές οι μεταλλάξεις και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι γνωστό ότι προκαλούν ασθένειες λόγω μιτοχονδριακών δυσλειτουργιών, οξειδωτικών βλαβών, μη φυσιολογική συσσώρευση και φωσφορυλίωση πρωτεϊνών, διαδραματίζοντας καταλυτικό ρόλο στη ντοπαμινική λειτουργία και επιβίωση των νευρώνων. Η α-συνουκλεΐνη δημιουργεί συσσωματώματα είτε λόγω μεταλλάξεων είτε λόγω οξειδωσης των κατεχολαμινών με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η αποικοδόμηση της από την ουβικουΐτινιωμένη πρωτεάση (UPS), προκαλώντας ER στρες και μιτοχονδριακή δυσλειτουργία. Η μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και οι οξειδωτικές βλάβες μειώνουν την παραγωγή ATP, η οποία παρεμποδίζει την αποικοδόμησή της α-συνουκλεΐνης συμβάλλοντας στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Η β-συνουκλεΐνη είναι γνωστό ότι παρεμποδίζει την συσσώρευση της α-συνουκλεΐνης μέσω της ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού Akt. Η Parkin, μία E3 ουβικουτινική λιγάση, προκαλεί πρωτεϊνική αποικοδόμηση, αυξάνει τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα μέσω της ενεργοποίησης του μιτοχονδριακού μεταγραφικού παράγοντα A (TFAM) και μπλοκάρει τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία που προκαλείται από την PINK1, ενώ παθογόνες μεταλλάξεις και οξειδωτικές βλάβες καταστρέφουν σημαντικά την προστατευτική της δράση. Η DJ-1 έχει προστατευτική

δράση έναντι στο οξειδωτικό στρες, μπλοκάροντας τη συσσώρευση της α -συνουκλεΐνης και προστατεύοντας τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα. Η PINK1 φαίνεται να προστατεύει από μιτοχονδριακές δυσλειτουργίες λόγω παθολογικών μεταλλάξεων, αν και ο ρόλος της δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Η LRRK2 διαδραματίζει ρόλο στη λειτουργία των συναπτικών κυστιδίων, ενώ παθολογικές μεταλλάξεις στο γονίδιο αυτό προκαλούν μη φυσιολογική φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών με συνέπεια τον μιτοχονδριακά εξαρτώμενο κυτταρικό θάνατο. Επιπρόσθετα, η PGC-1 α φαίνεται να έχει έναν νευροπροστατευτικό ρόλο έναντι των οξειδωτικών βλαβών και της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας, ενώ τα σηματοδοτικά μονοπάτια PI3kinase-Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt) και Nrf2/ARE ενέχονται στην παθογένεια στην νόσο Πάρκινσον (ΝΠ). Τα οικογενή γονίδια που έχουν συσχετιστεί με τη ΝΠ, parkin, DJ-1 και PINK1 ενεργοποιούν το μονοπάτι PI3 kinase-Akt, ενώ η ενεργοποίηση του μονοπατιού Nrf2/ARE εμποδίζει τις οξειδωτικές βλάβες και τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, προωθώντας την επιβίωση του κυττάρου. Και τα δύο παραπάνω σηματοδοτικά μονοπάτια θα μπορούσαν να μελετηθούν ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι. Τα πράσινα βέλη υποδεικνύουν την ενεργοποίηση-προώθηση διαδικασιών, ενώ τα κόκκινα την αναστολή –παρεμπόδισή τους.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I. ΣΚΟΠΟΣ / ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσης διατριβής είναι να μελετηθεί ένα δείγμα Ελλήνων ασθενών που πάσχουν από οικογενή μορφή της νόσου Parkinson, κληρονομούμενη με επικρατή αυτοσωμικό χαρακτήρα, προκειμένου να καταγραφούν γονιδιακές μεταλλάξεις που ενέχονται στην εμφάνιση αυτής της μορφής της νόσου. Η γονιδιακή μελέτη αφορά στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης το οποίο ήταν και το πρώτο που συσχετίστηκε με αυτή τη μορφή της νόσου και στο γονίδιο της LRRK2, το οποίο είναι το πιο πρόσφατα μελετημένο γονίδιο (και η πιο συχνή αιτία κληρονομικής νόσου Parkinson με αυτοσωματικό τρόπο κληρονόμησης), με μεγάλη ποικιλία μεταλλάξεων λόγω του μεγάλου μεγέθους του.

II. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Βιολογικό Υλικό

Η μελέτη γονιδιακών μεταλλάξεων έγινε σε σύνολο 55 ασθενών από διαφορετικές οικογένειες. Πρόκειται για 35 γυναίκες και 20 άντρες με οικογενή μορφή της νόσου Parkinson, κληρονομούμενη με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα (AdPD). Οι ασθενείς αυτοί συγκεντρώθηκαν από το Εξωτερικό Νευρολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και από το Εξωτερικό Νευρολογικό Ιατρείο του Γενικού Νοσοκομείου Τρικάλων σε μία περίοδο 3 ετών. Οι μάρτυρες είναι άτομα που ζούνε στην ίδια γεωγραφική περιοχή (Θεσσαλία) και είναι σε αντιστοιχία ως προς την ηλικία και το φύλο με τους ασθενείς που μελετήθηκαν. Πρόκειται για άτομα που επισκέφθηκαν το Εξωτερικό Νευρολογικό Ιατρείο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας, στα οποία έγινε έλεγχος και δε διαπιστώθηκε σε αυτά καμία νευρολογική νόσος.

Η καταγραφή των ασθενών αυτών περιλαμβάνει:

1. Πλήρες ιατρικό ιστορικό.
Δόθηκε βαρύτητα στην καταγραφή της εμφάνισης των πρώτων συμπτωμάτων και στον τρόπο έναρξης της νόσου, στην ηλικία έναρξης της νόσου, στην κλινική εικόνα σήμερα και στη φαρμακευτική αγωγή που λαμβάνει ο ασθενής.
2. Αντικειμενική νευρολογική εξέταση
3. Απεικονιστικός έλεγχος με Αξονική και Μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου για να αποκλείσουμε άλλες παθολογικές οντότητες.

4. Καταγραφή της κλίμακας U.P.D.R.S.(Unified Parkinson's Disease Rating Scale), της κλίμακας Modified Swab and England Activities of Daily Living Scale και σταδιοποίηση με την Modified Hoehn and Yahr Staging Scale. [110]

5. Λεπτομερή καταγραφή του γενεαλογικού δένδρου

6. Αιμοληψία για την απομόνωση DNA μετά από συγκατάθεση τους.

Η απομόνωση DNA έγινε με εξαλάτωση και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ακόλουθη:

- Φυγοκέντρηση 15 ml αίματος για 15 λεπτά στις 3000 rpm και στους 4°C
- Αφαιρούμε τον υπερκείμενο ορό και αραιώνουμε το ίζημα με νερό έως τα 12 ml περίπου
- Φυγοκεντρούμε εκ νέου για 15 λεπτά στις 3000 rpm και στους 4°C
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο υγρό και κρατάμε το ίζημα, όπου και προσθέτουμε lysis I μέχρι τα 12 ml
- Φυγοκεντρούμε ξανά για 15 λεπτά στις 3000 rpm και στους 4°C
- Επαναλαμβάνουμε την προσθήκη lysis I και τη φυγοκέντρηση
- Κρατάμε το ίζημα και προσθέτουμε lysis II μέχρι τα 6 ml
- Μετά από 30 λεπτά προσθέτουμε 750λ SDS και 100λ πρωτεΐνάση K (10 mg/ml)
- Αφήνουμε το μείγμα για τουλάχιστον 10 ώρες στους 37° C
- Στη συνέχεια προσθέτουμε 2 ml NaCl 6M, ανακατεύουμε και φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στις 3000 rpm στους 4° C
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και φυγοκέντρωσή του για 15 λεπτά στις 3000 rpm στους 4° C
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη σε αυτό διπλάσιου όγκου αιθανόλης σε σχέση με το αρχικό διάλυμα και CH₃COONa σε ποσότητα ίση με το 1/10 του αρχικού διαλύματος

- Αφήνουμε το μείγμα στους -20°C για λίγες ώρες
- Φυγοκεντρούμε για 50 λεπτά στις 3000 rpm στους 4°C
- Ξεπλένουμε το ίζημα με 1 ml αιθανόλης 70% και φυγοκεντρούμε για 30 λεπτά στις 12000 rpm στους 4°C
- Το παραπάνω στάδιο επαναλαμβάνεται άλλες δύο φορές και στη συνέχεια αφαιρείται το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει
- Διαλύουμε το τελικό ίζημα με νερό. Έλεγχος της ποσότητας και της ποιότητας του εξαχθέντος DNA με αυτό τον τρόπο, γίνεται με φωτομέτρηση και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης).

Ο μέσος όρος ηλικίας των 55 ασθενών με οικογενή μορφή της νόσου (αυτοσωμικού επικρατούς τύπου), που μελετήθηκαν ήταν τα 70 ± 9.7 έτη, ενώ το ηλικιακό εύρος εκτείνονταν από τα 40 έως και τα 82 έτη κατά την εξέταση. Ο μέσος όρος της ηλικίας έναρξης της νόσου ήταν τα 60 ± 9.2 έτη με ηλικιακό εύρος από τα 38 έως και τα 80 έτη.

Από τους 55 ασθενείς, που μελετήθηκαν, οι 10 (18.2%) είχαν ένα συγγενή που έπασχε από AdPD, οι 19 (34.5%) είχαν δύο συγγενείς με AdPD, οι 19 (34.5%) είχαν τρεις συγγενείς με AdPD, οι 6 (10.9%) είχαν πέντε συγγενείς με AdPD και τέλος μόνο ένας είχε 7 (1.8%) συγγενείς που παρουσίαζαν νόσο Parkinson αυτοσωμικού τύπου.

Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που μελετήθηκαν.

<u>ΑΣΘΕΝΕΙΣ</u>	<u>No 55</u>	
Ηλικία κατά την καταγραφή Μέσος όρος και εύρος ηλικίας	70 (40 έως 82)	
Ηλικία έναρξης Μέσος όρος και εύρος	60 (38 έως 80)	
Διάρκεια νόσου (έτη)	5.9 (1 έως 19)	
Άντρες (αριθμός / ποσοστό)	20 (36.36%)	
Γυναίκες (αριθμός / ποσοστό)	35 (63,63%)	
Αριθμός συγγενών με AdPD (αριθμός / ποσοστό)		
	1	10 (5.5%)
	2	19 (10.45%)
	3	19 (10.45%)
	5	6 (33%)
	>5	1 (1.8%)
	Κλινικά ευρήματα των υπό μελέτη ασθενών	Απόλυτος αριθμός/ποσοστό
	Έναρξη με τρόμο	30(54.45%)
	Βραδυκινησία	35(63.33%)
	Υπέρταση	36(64.45%)

	Διαταραχές στάσης	34(61.81%)
	Ασυμμετρία	5(9.09%)
	Τρόμος ηρεμίας	45(81.8%1)
	Ανταπόκριση στη levodopa >5 έτη	34(61.81%)
	Χορειακές κινήσεις (από τη levodopa)	6(10.9%)
	Hoehn and Yahn score (staging 0-5) (μέσος όρος/ποσοστό)	1.76
	Schwab and England activities of daily living score (1-100%)	70%
	UPDRS score (maximum score 147)	70.9
	Psychiatric symptoms (UPDRS I) (maximum score 16)	2.7
	Activities of daily living (UPDRS II) (maximum score 52)	18.44
	Motor examination (UPDRS III) (maximum score 56)	16.8
	Θεραπευτικές επιπλοκές (UPDRS IV) (maximum score 23)	2.2

β. Μέθοδοι

Γενετικό υλικό ασθενών με την οικογενή αυτοσωμική επικρατή μορφή της νόσου Parkinson μελετήθηκε λεπτομερώς για μεταλλάξεις στα γονίδια της SNCA και της LRRK2 με προσδιορισμό της πρωτοταγούς ακολουθίας του DNA (sequencing). Επίσης για τους ίδιους ασθενείς πραγματοποιήθηκε ανάλυση «δόσης γονιδίου» (gene dosage analysis) της SNCA με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση της DNA πολυμεράσης (Quantitative Polymerase Chain Reaction:PCR) του γονιδιακού DNA.

III.ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

A) SNCA

Για το γονίδιο της α- συνουκλεΐνης μελετήθηκαν ξεχωριστά τα 7 εξόνια του γονιδίου. Η περιοχή του κάθε εξονίου ενισχύθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR με τους εκκινητές :

1.CCATGGGTCTACAAACCATTC / TGTGTTCTACTTTTCCCAGTATAAGC

2. CATTATGCTGCCATCTATTTACAG / ATGCTACTTATCCATTATTATGCAAC

3.TTGCTCAATCACTTCCATTG/ CACAGGACAGAAAAGGCATTG

4.AAGCACACCTCATTCTGTTGG / CCTGAAGGTGATGAGATCAAAATAC

5.CTCTTGTAAGTGGAGGTGGC / CACATAGAAGTCCGGAAAAATATAC

6.ATGCTTTCCTGTAAATTTGGAC / AAATATTGATATTCTACCTGGCCC

7.ATATTGGTTCTGCCCTCCTG / CAGAAAGATTTACATTTAGTCGACAG

Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση PCR ήταν 15ml και περιείχε:

- 2μl DNA (C: 10ng/μl)
- 1μl από κάθε εκκινητή
- 1μl dNTPs
- 13,4μl H₂O
- 2,5 μl 10x Buffer
- 0,4μl Q solution

Το πρόγραμμα ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν:
Αρχικά αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, για τρία λεπτά στους 94° C.

Ακολουθούν:

- 30 sec στους 92°C
- 30 sec στους 55°C
- 40 sec στους 72°C

Ο θερμοκρασιακός αυτός κύκλος επαναλαμβάνεται 40 φορές.

Ακολουθεί ένα στάδιο επιμήκυνσης των αλυσίδων DNA για 10 min στους 72°

Στη συνέχεια ακολουθεί η κάθαρση του προϊόντος PCR με ειδικά plates (QIA quick purification plates)

Στη συνέχεια ακολουθεί η αντίδραση αλληλουχίας βάσεων:

5μl of PCR product

1μl of Big Dye

1μl of primer

2,5 μl of 5x Buffer

0,5μl of H₂O

Η αντίδραση επαναλαμβάνεται για κάθε primer forward και reverse

Τα προϊόντα αναλύθηκαν στο γενετικό αναλυτή ABI 3100. Τα

χρωματογράμματα αποτυπώθηκαν γραφικά με τον αναλυτή Sequencer (Genecodes, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Επίσης στο γονίδιο της α-συνουκλεΐνης έγινε έλεγχος για πολλαπλασιασμούς. Χρησιμοποιήθηκε ποσοτική διπλή PCR στο γενωμικό υλικό των ασθενών. Η ανάλυση έγινε στον ανιχνευτή βάσεων ABI Prism 7900 Sequence detection system (Applied Biosystems). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε αυτό της βήτα αιμοσφαιρίνης. Έγινε σήμανση με χρωστικές εκκινητών 6-FAM και VIC για τα γονίδια της βήτα αιμοσφαιρίνης και της SNCA (χρησιμοποιήθηκαν η ανωτέρω αναφερόμενοι εκκινητές σεσημασμένοι με χρωστικές).

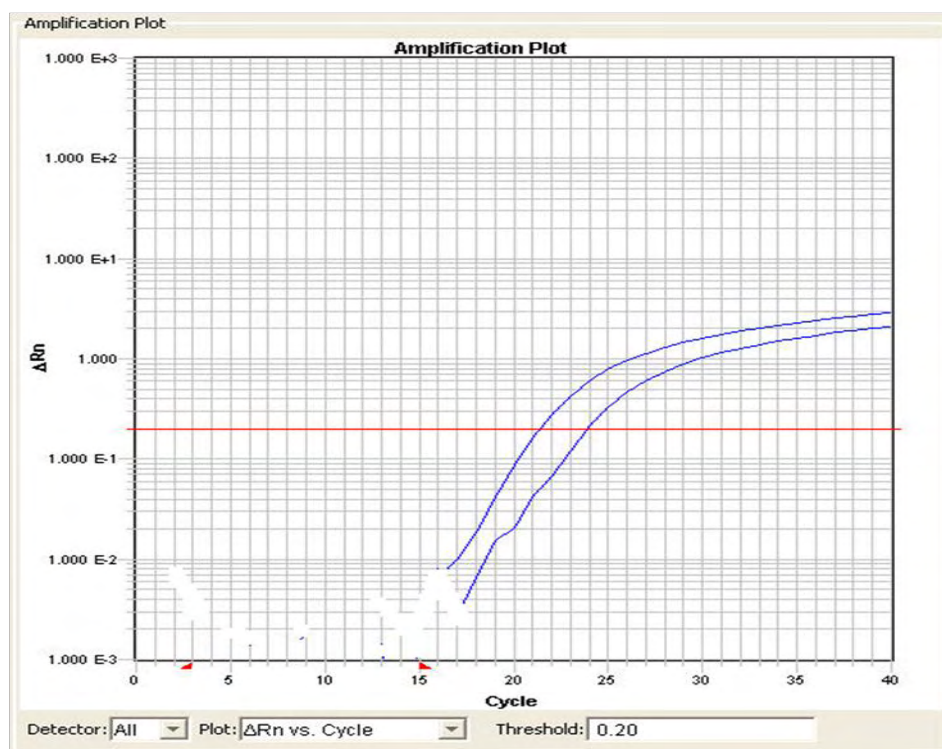
Ο συνολικός όγκος για κάθε αντίδραση PCR ήταν 15ml και περιείχε:

- 1,5 µl DNA (C: 10mg/ml)
- 10 µl 2x Taqman mix
- 0,9 µl Primer F 20M
- 0,9 µl Primer R 20M
- 0,5 µl synouclein probe VIC 10M
- 0,9 µl β-globin primer F 20M
- 0,9 µl β-globin primer R 20M
- 0,5 µl β-globin probe FAM 10M
- 0,4 µl H₂O

Το πρόγραμμα ενίσχυσης ήταν κοινό για όλες τις PCR που έγιναν

- 2min στους 50° C
- 10min στους 50° C
- 15min στους 95° C → ο θερμοκρασιακός αυτός κύκλος επαναλαμβάνεται 40 φορές
- 1min στους 60° C
- 15min στους 4° C

Το ποσοτικό σήμα των εξονίων της SNCA σε σύγκριση με αυτό της βήτα αιμοσφαιρίνης καθορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Για την ετερόζυγη απάλειψη (deletion) το αποτέλεσμα της μέτρησης ήταν μεταξύ 0,8 και 1,2, για τον ετερόζυγο διπλασιασμό ανάμεσα στο 1,3 και στο 1,7 και στον ομόζυγο διπλασιασμό ή τριπλασιασμό η τιμή είναι >1,8. (Εικόνα 7)



Εικόνα 7. Διάγραμμα στο οποίο φαίνεται το ποσοτικό σήμα της α-syn σε σύγκριση με αυτό της b-αιμοσφαιρίνης

B) LRRK2

Για το γονίδιο της LRRK2 μελετήθηκαν ξεχωριστά τα 51 εξόνια του γονιδίου. Η περιοχή του κάθε εξονίου ενισχύθηκε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR με τους εκκινητές :

Forward/ reverse

- 1 CCTGCCGGTTCCTGAG / TTTGCAAATGTAAGGAGGGG
- 2 GGGGTGCTGTGGATTGTG / GCCAGTAAAACGTCTCCTTCC
- 3 TTGAAGAGATTCATGTTTGACTGAG / CAAGGGAAGGTTGTCATGTG
- 4 ACTACAGGGAATTAAATACAATGAGAG/CAAGCTACCCTAATCCTGATCTTC

5 CCATGGGTCTACAAACCATTG / TGTGTTCTACTTTTCCCAGTATAAGC
 6 GAAGGGCTGCTTCACAGAAA / GGGTTGAGCATCCACAAGTT
 7 CATTATGCTGCCATCTATTTACAG / ATGCTACTTATCCATTATTATGCAAC
 8 TTGCTCAATCACTTCCATTG / CACAGGACAGAAAAGGCATTG
 9–10 AAGCACACCTCATTCTGTTGG / CCTGAAGGTGATGAGATCAAAATAC
 11 CTCTTGTAAGTGGAGGTGGC / CACATAGAAGTCCGGAAAAATATAC
 12 ATGCTTTCCTGTAAATTTGGAC / AAATATTGATATTCTACCTGGCCC
 13 ATATTGGTTCTGCCCTCCTG / CAGAAAGATTTACATTTAGTCGACAG
 14 CAGCATCTTAAAGCACAGCC /AAAAAGCGCCCCTAGTTCTC
 15–16 TACAATGCCTGGCACAGAAC /TGCTCCAAAAGTGAAATTG
 17–18 GATAAATACTTTAAAGCACCAACCC / GATACACAATGGCAGGGCTC
 19 GAAGTTTGATTTGCCAGTCTCC / TCAAAGTGGCATGAATAACCAC
 20 GCAATACGTAAGAACTTTGGTCC /GGTCAGGTTTTTGTCTTGGG
 21 AAGTGAAAAACCAACATGGC /ACATCAGGGAAATCCCTACC
 22 TTCCATAATTATAAATACCATTAAACC / ACCAAACACTGCATTCTGCC
 23 AGCCTGATTGCTAGGAGGTG /GGGGGACTTATCACCCAGTG
 24 GCTAGACTTAAGTTCCTCAGATGG / TCAGCATATTTAGGCAACCC
 25 TCCTCTTTGATGCTGTTCTTTG /TGCCACTTTTAAATCCACAAC
 26 CACTATTGGTAGCTGTTCTTATTTTTG / AAGGTTCTGTTCCAGCTAATGTG
 27 GGTGGTTCAACTTCAGGCTC / AATGGAAATTAATTAAGTGACACATC
 28 CTTCTTCCCACCAACAGG /TGTCATCAAAGTCACAGAGAG
 29 TTTTACCAAACATTATCAACTACCC /TCCCTGTTCCAAACAAATGG
 30 GGATTCTTGCCTGTCGTTTG /ACTGAAGCAATTGTTTGCCC
 31 AGCAGGCCCAGTTTGAAAG / GACATTTCTAGGCAGTTGAGAATC
 32 CTGAATTTGCCAACCATTG / GAACCGTATGGATATTCTCTCAAC
 33 AAAGCCCCTTGATATTTGTTC/ ATGCTTTGACCATAACCCCC
 34 TGGTTGCTAGAGAAATTAGGTACT/
 AATGATACATGTCAGTAGGAGGTTTAC
 35 AGGTTGGGTGTTTTGTGAGG/ATGCCATCTCCCTAATTTCTC
 36–37 TGGATCTTAATGTGCAGGGG/CAGCATTCAAACCCTCAAATC
 38 GGATTGGTTAGAAAGGGAGGG/GATTATGTGCAAAACAAATTCCAG

39 TTCAATGAAACAAGTAGGTCAGG/CACAAAACCTTTCTACTCCACAACG
 40 CATGTTCAAGCCTGTTGATGC/GGCACAGTGTTACTGGGAAG
 41 GCACAGAATTTTTGATGCTTG/GAGGTCAGTGGTTATCCATCC
 42 TATGAGCCCTGATGTTGGTC/CAATTAAATAAAAAATGAAGCTGCTG
 43 TTTCTTTGCAATGTCTGGACC/TTGTGCCTGGGATGGTG
 44 TTGTGCCTGGGATGGTG/CAAAACACATTTGCTCTTGAATAC
 45 CCTTTATTCTGTACAAGTTCTAGTTGC/TGAACAATCTTTGCTGATGC
 46 AAAGTGGAGGAGAACATTAAGGC/AATCCCATAAGAGGGGTGTG
 47 TTTGAAAGCACAGATTTTATGGAG /
 AAGATCTTCCTTATGAATTATCAACAG
 48 TCAATTCAGAATGGTTAGGGAAG / GAAAAGATGGTGCTGAGAAGC
 49 TGCATAATGGTGGTGGTGTC/ TGTGACCCTCCAAGACCATC
 50 TTCAGTTCCAAGGTATTTGTGTC / TGTTACCATCATTCACATCATTG
 51 TTTGAACAGTGTTTGAAAAAGC / CATTCGATGCAATCTAAGAAGG

Ο συνολικός όγκος για την αντίδραση PCR ήταν 15ml και περιείχε :

- 2μl DNA (C: 10ng/μl)
- 1μl από κάθε εκκινητή
- 1μl dNTPs
- 13,4μl H₂O
- 2,5 μl 10x Buffer
- 0,4μl Q solution

Το πρόγραμμα ενίσχυσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν:

Αρχικά αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, για τρία λεπτά στους 94° C.

Ακολουθούν:

- 30 sec στους 92°C
- 30 sec στους 60°C
- 40 sec στους 50°C

Ο θερμοκρασιακός αυτός κύκλος επαναλαμβάνεται 40 φορές.

Ακολουθεί ένα στάδιο επιμήκυνσης των αλυσίδων DNA για

10 min στους 72° C

Στη συνέχεια ακολουθεί η κάθαρση του προϊόντος PCR με ειδικά plates (QIA quick purification plates)

Στη συνέχεια ακολουθεί η αντίδραση αλληλουχίας βάσεων:

5µl of PCR product

1µl of Big Dye

1µl of primer

2,5 µl of 5x Buffer

0,5µl of H₂O

Η αντίδραση επαναλαμβάνεται για κάθε primer forward και reverse

Τα προϊόντα αναλύθηκαν στο γενετικό αναλυτή ABI 3100. Τα

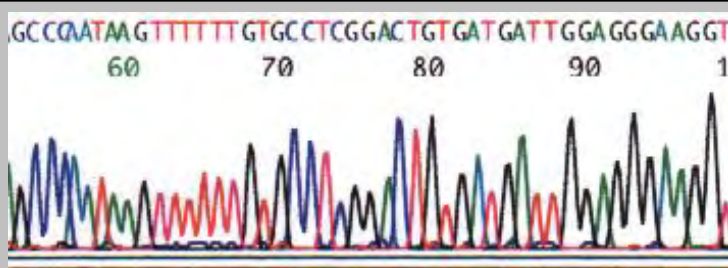
χρωματογράμματα αποτυπώθηκαν γραφικά με τον αναλυτή Sequencer (Genecodes, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

-SNCA

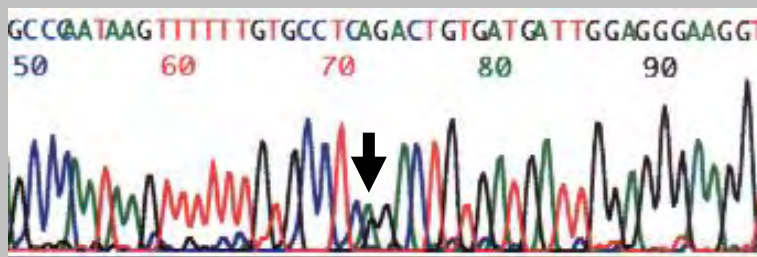
Μελετώντας τα δείγματα DNA των ασθενών καθώς και των υγιών μαρτύρων δε βρέθηκαν σημειακές μεταλλάξεις (Εικόνα 8) στο γονίδιο της α-συνουκλείνης, παρά το γεγονός ότι μελετήθηκαν άτομα, τα οποία με βάση το οικογενειακό τους δένδρο είχαν ενδείξεις ισχυρής κληρονομικότητας της νόσου. Επίσης αρνητικός ήταν και ο έλεγχος για πολλαπλασιασμό του γονιδίου.

Παράδειγμα αποκωδικοποιημένης περιοχής DNA στην περιοχή της μετάλλαξης A53T στο γονίδιο της α-συνουκλείνης (φυσιολογικό)



Παράδειγμα αποκωδικοποιημένης περιοχής DNA στην περιοχή της μετάλλαξης A53T στο γονίδιο της α-συνουκλείνης (θετικός μάρτυρας)

CAG

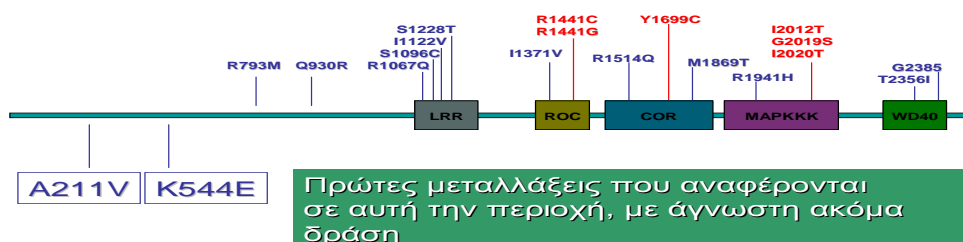


Εικόνα 8

-LRRK2 G2019S variant

Η μετάλλαξη αυτή δεν βρέθηκε στον πληθυσμό που ελέγχθηκε, αν και αποτελεί την πιο συχνή μετάλλαξη που συναντάται σε ασθενείς με οικογενή μορφή της νόσου Parkinson με αυτοσωμικό επικρατή χαρακτήρα.

Δύο καινούριες μεταλλάξεις (ετερόζυγες αντικαταστάσεις), ταυτοποιήθηκαν στο γονίδιο της LRRK2 (Εικόνα 9). Πρόκειται για τις A211V και K544E οι οποίες βρέθηκαν σε δύο ασθενείς με αυτοσωμικό επικρατή τύπο της νόσου. Είναι η πρώτη φορά που ταυτοποιούνται μεταλλάξεις σ' αυτή τη θέση του γονιδίου και πιθανώς να είναι παθογόνες γιατί δεν ανευρέθησαν στους υγιείς μάρτυρες. Αυτό όμως δεν μπορεί να ειπωθεί με βεβαιότητα γιατί δεν γνωρίζουμε με σαφήνεια τον ρόλο των εξονίων που φέρουν τις μεταλλάξεις.



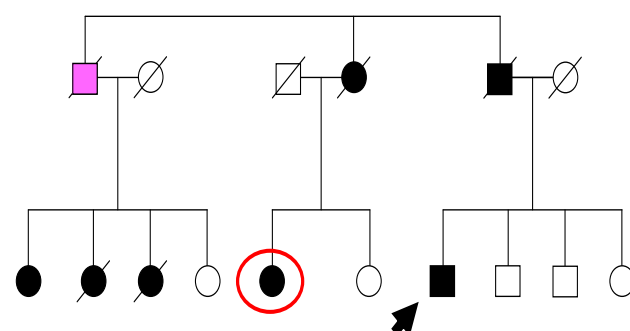
Εικόνα 9

-LRRK2 K544E variant

Η μορφή κληρονομικότητας στην οικογένεια TIF200 με την αντικατάσταση Lys544Glu είναι αυτοσωμική επικρατής, περιορισμένης διεισδυτικότητας (Εικόνα 10). Μετά από την ταυτοποίηση αυτής της μετάλλαξης διερευνήθηκε η πιθανή παθογόνος δράση της μελετώντας άλλα μέλη της οικογένειας με τη μέθοδο της ανάλυσης σύνδεσης.

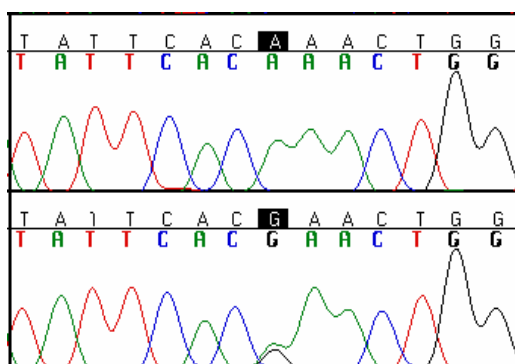
Από την οικογένεια αυτή (TIF200) τα μέλη που ήταν διαθέσιμα για εξέταση ήταν τα III1,4,5,6,7,8 και 10. Σ' αυτά τα μέλη έγινε μελέτη της αλληλουχίας του γενετικού τους υλικού. Από τον έλεγχο αυτό βρέθηκαν δύο άτομα που ήταν φορείς της μετάλλαξης και παρουσίαζαν νόσο του Parkinson, τα TIF200-III1 και TIF200-III7. Μέλη της οικογένειας που δεν παρουσίαζαν εικόνα της νόσου δε βρέθηκαν να είναι φορείς της μετάλλαξης. Επίσης δεν μπόρεσε να ταυτοποιηθεί αυτή η μετάλλαξη στο τρίτο μέλος της οικογένειας που παρουσιάζει τη νόσο TIF200-III5. Το μέλος TIF200-III1 είναι μία 73χρονη γυναίκα με ηλικία έναρξης τα 65 έτη. Η πρώτη εκδήλωση της νόσου στη γυναίκα αυτή ήταν ετερόπλευρος τρόμος, ο οποίος στη συνέχεια με την εξέλιξη της νόσου επεκτάθηκε και στα τέσσερα άκρα. Ήπια υπέρταση και βραδυκινησία ήταν παρούσες. Η ασθενής παρουσίαζε καλή ανταπόκριση στη θεραπεία με L-Dopa. Η μητέρα της ασθενούς αυτής πέθανε σε ηλικία 72 ετών και από το συγγενικό περιβάλλον αναφέρεται ότι παρουσίαζε συμπτώματα τα οποία θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε ιδιοπαθή τρόπο. Ο πατέρας της TIF200-III1 πέθανε στην ηλικία των 50 χρόνων χωρίς να παρουσιάζει κανένα σύμπτωμα νευρολογικής νόσου. Το μέλος TIF200-III5 είναι μία γυναίκα 65 χρόνων με ηλικία έναρξης της νόσου τα 63 έτη. Η μητέρα αυτής της ασθενούς με νόσο Parkinson πέθανε σε ηλικία 78 χρόνων, αλλά τα μέλη της οικογένειάς της, αναφέρουν ότι 15 χρόνια πριν από το θάνατό της είχε παρουσιάσει συμπτώματα συμβατά με νόσο Parkinson όπως τρόμο, διαταραχές στάσης και αστάθεια. Το μέλος TIF200-III7 είναι ένας άντρας 65 χρόνων με ηλικία έναρξης της νόσου τα 60 έτη. Από οικογενειακές αναφορές γνωρίζουμε ότι ο πατέρας αυτού του ατόμου πέθανε στην ηλικία των 75 χρόνων, αλλά 15 χρόνια πριν πεθάνει παρουσίαζε συμπτώματα τυπικά της νόσου Parkinson. Τόσο το μέλος TIF200-III5 όσο και το μέλος TIF200-III7 παρουσιάζουν φαινότυπο παρόμοιο με το μέλος TIF200-III1, επιπλέον ο ασθενής TIF200-III7 παρουσίασε μία ήπια μορφή κατάθλιψης τρία χρόνια μετά την έναρξη των συμπτωμάτων της νόσου.

Family TIF200



Ιδιοπαθής τρόμος

Φαινοτυπικό
αντίγραφο
(Phenocopy)



control

patient

- τρόμος
- ηλικία έναρξης 60-65έτη
- καλή απάντηση στη levodopa

K544E (c.1630 A>G, exon 14)

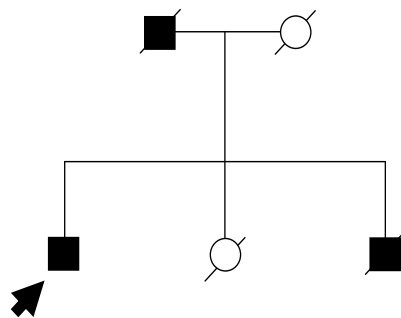
Εικόνα 10

-LRRK2 A211V variant

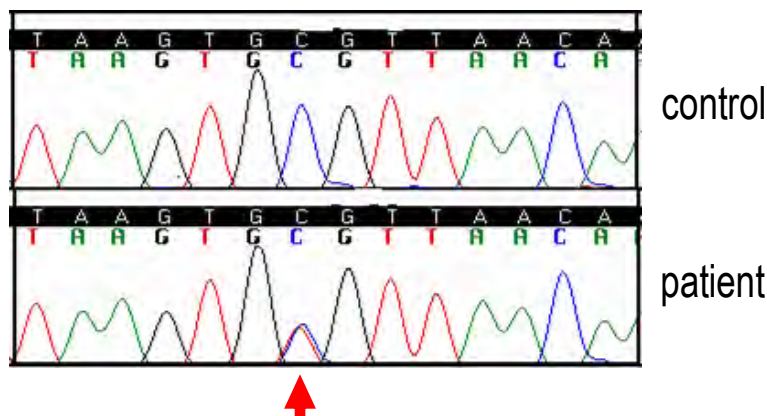
Η μορφή κληρονομικότητας στην οικογένεια TIF318, με την αντικατάσταση A211V, είναι αυτοσωμική επικρατής και αποκλείεται η περίπτωση αιμομηξίας. (Εικόνα 11) Μόνο ένα άτομο που παρουσίαζε νόσο Parkinson, από την οικογένεια αυτή ήταν διαθέσιμο για μελέτη. Πρόκειται για έναν άντρα 80 χρόνων, του οποίου ο πατέρας ο οποίος παρουσίαζε τη νόσο, καθώς και ο αδελφός του που είχε νόσο Parkinson, πέθαναν πριν από την έναρξη της μελέτης αυτής. Η ηλικία έναρξης της νόσου στον ασθενή που μελετήθηκε ήταν τα 75 έτη. Αρχικά παρουσίασε ετερόπλευρο τρόμο που στη συνέχεια επεκτάθηκε στα τέσσερα άκρα. Επίσης ο ασθενής παρουσίαζε κατά την κλινική του εξέταση υπέρταση, βραδυκινησία και διαταραχές στάσης. Ο

ασθενής αυτός τα τελευταία τέσσερα χρόνια είναι σε αγωγή με L-Dopa , στην οποία ανταποκρίνεται ικανοποιητικά. Μέλη της οικογένειας αυτής αναφέρουν ότι ο πατέρας του ασθενούς που μελετήθηκε (TIF318- II1) πέθανε σε ηλικία 73 χρόνων και 5 χρόνια πριν είχε παρουσιάσει τρόμο και βραδυκινησία. Από αναφορά νευρολόγου προκύπτει ότι ο αδερφός του μέλους TIF318- II1 παρουσίασε τρόμο βραδυκινησία και υπέρτονία 7 χρόνια πριν από το θάνατό του (απεβίωσε σε ηλικία 76 χρόνων). Τα τελευταία 5 χρόνια της ζωής του βρισκόταν σε αγωγή με L-Dopa στην οποία είχε ικανοποιητική ανταπόκριση.

Family TIF318



- 80 yrs old
- AO at 75 yrs
- Initial symptom – unilateral tremor
- Currently
 - Bradykinesia, rigidity
 - postural instability
 - good response to levodopa
 - no dementia



A211V (c.632 C>T, exon 5)

Εικόνα 11

V. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μετάλλαξη G209A στο γονίδιο της α-συνουκλείνης συσχετίσθηκε με αυτοσωμική μορφή της νόσου Parkinson στην οικογένεια των Contursi στην Ιταλία και σε τρεις Ελληνικές οικογένειες που δε σχετίζονταν μεταξύ τους. Προσπάθειες για ταυτοποίηση της μετάλλαξης σε μεγάλες σειρές ασθενών τόσο με σποραδική όσο και με οικογενή μορφή της νόσου, γίνανε από επιστήμονες σε όλο τον κόσμο. Οι Papadimitriou et al. 1999 [11] παρουσίασαν δύο επιπλέον οικογένειες με οικογενή αυτοσωμική επικρατή μορφή της νόσου του Parkinson που έφεραν τη μετάλλαξη G209A. Και στις δύο οικογένειες ωστόσο βρέθηκαν ασυμπτωματικοί φορείς οι οποίοι είχαν ξεπεράσει την ηλικία, στην οποία είχε γίνει η έναρξη της νόσου, στα μέλη της οικογένειας που νοσούσαν.

Οι Bostantjoroulou et al. 2001 [111] μελέτησαν τις κινητικές και νευροψυχικές ανωμαλίες σε οχτώ Έλληνες ασθενείς με PD που είναι φορείς της μετάλλαξης G209A του γονιδίου της α συνουκλείνης. Τα συμπτώματά τους ξεκίνησαν ανάμεσα στην ηλικία των 32-50 χρόνων και τη στιγμή της εξέτασης είχαν μέση διάρκεια της νόσου τα 5.4+/- 2.1 έτη. Η υπέρταση και η βραδυκινησία προεξήρχαν στην κλινική εικόνα τόσο κατά την έναρξη όσο και κατά την πορεία της νόσου, ενώ ο τρόμος ηρεμίας δεν ήταν σύνηθες κλινικό εύρημα. Η νευροψυχική εκτίμηση έδειξε ότι από τους υπό μελέτη ασθενείς, ένας παρουσίασε ήπια ανοϊκή συνδρομή ενώ ένας άλλος παρουσίασε διαταραχές μνήμης και απραξία. Καταθλιπτική συνδρομή παρουσιάστηκε μόνο σε ένα ασθενή. Τα ευρήματα της μελέτης αυτής δείχνουν ότι οικογενής μορφές νόσου Parkinson μοιράζονται κοινά κινητικά και γνωσιακά χαρακτηριστικά με τη σποραδική μορφή της νόσου. Επιπλέον αναδεικνύει την παρατήρηση ότι όταν επικρατούν γνωσιακές διαταραχές και ο τρόμος είναι ήπιος, θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή της μελέτης των περιστατικών γιατί πρόκειται για ιδιαίτερη κλινική εικόνα της νόσου.

Μέχρι τώρα, στην περιοχή της Θεσσαλίας, μόνο σε τέσσερις οικογένειες με αυτοσωμική επικρατή μορφή της νόσου (με ηλικία έναρξης μικρότερη των 50 χρόνων), βρέθηκε η μετάλλαξη A53T στο γονίδιο SNCA .

Στον πληθυσμό που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή (55 ασθενείς με αυτοσωμική επικρατή μορφή της νόσου του Parkinson καθώς και υγιείς μάρτυρες αντίστοιχης ηλικίας και καταγωγής), δε βρέθηκε καμία μετάλλαξη στο γονίδιο της α συνουκλεΐνης (ούτε παρερμηνεύσιμες-missence-μεταλλάξεις ούτε πολλαπλασιασμοί του γονιδίου). Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι για πρώτη έγινε διερεύνηση σε ελληνικό πληθυσμό για την παρουσία ποσοτικών (διπλασιασμοί, τριπλασιασμοί, κλπ του γονιδίου) μεταλλάξεων σε ασθενείς με νόσο Parkinson. Μπορούμε λοιπόν να υποθέσουμε ότι στον Ελληνικό πληθυσμό (Θεσσαλικό) που μελετήθηκε οι μεταλλάξεις αυτές στο γονίδιο της SNCA δεν αποτελούν συχνή αιτία της αυτοσωμικής επικρατούς μορφής της νόσου.

Σημαντικές μελέτες έχουν γίνει για το συσχετισμό μεταλλάξεων στο γονίδιο της LRRK2 και της εμφάνισης της οικογενούς μορφής της νόσου Parkinson. Οι Di Fonzo et al. 2005 [112] μελέτησαν 61 οικογένειες με νόσο Parkinson, που δε σχετίζονταν μεταξύ τους, και παρουσίαζαν αυτοσωμική επικρατή μορφή κληρονομικότητας. Σε τέσσερις από αυτές ταυτοποιήθηκε η μετάλλαξη G2019S (6.6%) Οι οικογένειες αυτές είχαν καταγωγή από την Ιταλία την Πορτογαλία και τη Βραζιλία γεγονός που κάνει σαφές ότι η μετάλλαξη έχει ευρεία γεωγραφική κατανομή και συναντάται σε διάφορους πληθυσμούς. Στα άτομα που μελετήθηκαν τόσο η κλινική εικόνα όσο και ηλικία έναρξης ποίκιλλαν. Η μελέτη αυτή επιβεβαίωσε τη συσχέτιση μετάλλαξης στο γονίδιο της LRRK2 με την εμφάνιση της οικογενούς μορφής της νόσου Parkinson που κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο.

Οι Gilks et al. 2005 [113] μελέτησαν επίσης τη συχνότητα της ίδιας μετάλλαξης σε άτομα με σποραδική μορφή της νόσου. Μελετήθηκαν 482 άτομα με ιδιοπαθή νόσο Parkinson από τα οποία, στα 263 η νόσος ήταν και παθολογοανατομικά επιβεβαιωμένη. Μόνο σε οκτώ άτομα από τα 482 που μελετήθηκαν (ποσοστό 1.6%) βρέθηκε η μετάλλαξη G2019S αναδεικνύοντας την εμπλοκή της τόσο στην οικογενή όσο και στη σποραδική μορφή της νόσου.

Οι Nichols et al. 2005 [114] μελέτησαν 767 ασθενείς με νόσο Parkinson από 358 οικογένειες για τη μετάλλαξη G2019S. Μόνο 35 άτομα ήταν ή ετεροζυγότες (34) ή ομοζυγότες (1) για τη μετάλλαξη, κατέληξαν λοιπόν στο

συμπέρασμα ότι στη μετάλλαξη αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί ένα ποσοστό της τάξης του 5% των περιπτώσεων με οικογενή μορφή της νόσου.

Οι Kachergus et al 2005 [76] μελέτησαν τη μετάλλαξη G2019S στο γονίδιο LRRK2. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν 248 μέλη οικογενειών με οικογενή μορφή της νόσου από την Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική. Τα 7 (2.8%) από αυτά βρέθηκαν ετεροζυγώτες για τη μετάλλαξη. Στη συνέχεια μελετήθηκαν δείγματα ασθενών με σποραδική μορφή της νόσου, από τους ίδιους πληθυσμούς. Βρέθηκαν 6 άτομα με την ίδια μετάλλαξη. Μελετήθηκαν 42 μέλη των οικογενειών των 13 φορέων της μετάλλαξης. Από αυτά 22 ήταν επίσης φορείς της μετάλλαξης και 7 παρουσίαζαν νόσο Parkinson. Η διεισδυτικότητα της μετάλλαξης εξαρτάται από την ηλικία και αυξάνει από 17% στην ηλικία των 50 στο 85% στην ηλικία των 70 χρόνων. Η μελέτη αυτή τονίζει το γεγονός ότι ένα ποσοστό των περιπτώσεων νόσου Parkinson με προχωρημένη ηλικία έναρξης, πιθανώς να έχει γενετική βάση και να σχετίζεται με τη μετάλλαξη G2019S.

Οι Lesage et al. 2005 [115] ερεύνησαν άτομα με οικογενή, αυτοσωμική επικρατή, μορφή της νόσου για τη μετάλλαξη G2019S σε οικογένειες με καταγωγή κυρίως από τη Βόρεια Αφρική και τη Γαλλία. Η συχνότητα ανεύρεσης της μετάλλαξης ήταν εντυπωσιακά πιο υψηλή στους ασθενείς με καταγωγή από τη Βόρεια Αφρική (7/17, 41%) σε σχέση με τη συχνότητα ανεύρεσης της μετάλλαξης στους ασθενείς με καταγωγή από την Ευρώπη (5/174, 2.9%). Στις οικογένειες αυτές βρέθηκαν και 15 άτομα φορείς της μετάλλαξης, που δε παρουσίαζαν εικόνα νόσου Parkinson, και η ηλικία τους ήταν από 32 έως 74 έτη.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, η μετάλλαξη δεν βρέθηκε σε Ασιατικό πληθυσμό που μελετήθηκε. Οι Tan et al 2005 [116] μελέτησαν 1000 παρκινσονικούς και υγιείς μάρτυρες και σε κανέναν δε βρέθηκε η υπό μελέτη μετάλλαξη. Ο επιπολασμός της G2019S μετάλλαξης στον ασιατικό πληθυσμό ανέρχεται σε λιγότερο από 0.1%, αποτέλεσμα το οποίο δείχνει ότι η γενετική της νόσου διαφοροποιείται ανάλογα με την εθνικότητα.

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στην οικογενή αυτοσωμική επικρατή μορφή της νόσου και την ανεύρεση της μετάλλαξης G2019S στο γονίδιο LRRK2. Το ποσοστό δε κυμαίνεται από 2.8-

41% και σαφώς ποικίλει ανάλογα με την περιοχή καταγωγής των ατόμων που ελέγχονται.[76, 112-115] Από τα παραπάνω στοιχεία καταλήγουμε επίσης στο συμπέρασμα ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο LRRK2 και συγκεκριμένα η G2019S μπορεί να ανευρίσκονται ακόμα και σε περιπτώσεις νόσου Parkinson χωρίς ισχυρό οικογενειακό ιστορικό. Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι ο φαινότυπος των φορέων της μετάλλαξης μοιάζει αρκετά με εκείνο των ασθενών με ιδιοπαθή μορφή της νόσου [76, 112, 113, 117, 118]. Ωστόσο στα 55 άτομα που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή, με οικογενή αυτοσωμική επικρατή μορφή της νόσου, με καταγωγή από τη Θεσσαλία δε βρέθηκε η συγκεκριμένη μετάλλαξη.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μας επιβεβαιώνονται και από λοιπές μελέτες που ακολούθησαν σε ελληνικούς πληθυσμούς. Συγκεκριμένα οι Spanaki et al μελέτησαν στην Κρήτη 92 άτομα με οικογενή μορφή της νόσου Parkinson και η μετάλλαξη ανιχνεύθηκε σε μόλις ένα άτομο που αντιστοιχεί σε ποσοστό 1.1%. Επίσης οι Paparetropoulos et al. μελέτησαν 47 άτομα με οικογενή μορφή της νόσου και σε κανένα δεν βρέθηκε η μετάλλαξη G2019S. Οι Kalinderi et al. μελέτησαν την ύπαρξη της μετάλλαξης σε 180 άτομα από τη βόρεια Ελλάδα με σποραδική μορφή της νόσου όπου και πάλι δεν απομονώθηκαν φορείς της εν λόγω μετάλλαξη. [119-121] .

Εκτός από την G2019S μετάλλαξη στο γονίδιο της LRRK2 και άλλες μεταλλάξεις έχουν μελετηθεί. Συγκεκριμένα, σε μελέτη πληθυσμού Βάσκων σε μία σειρά 137 ατόμων με νόσο Parkinson (30 άτομα με οικογενή μορφή της νόσου και 107 άτομα με σποραδική μορφή της νόσου) είχε βρεθεί η μετάλλαξη R1396G σε ποσοστό 8% (σε 10 άτομα, από τα οποία τα 6 είχαν θετικό οικογενειακό ιστορικό) [69].

Ωστόσο στα άτομα που ελέγχθηκαν, στην παρούσα μελέτη, από την περιοχή της Θεσσαλίας, με οικογενή μορφή της νόσου Parkinson καθώς και οι υγιείς μάρτυρες, δεν βρέθηκαν άλλες γνωστές μεταλλάξεις στο γονίδιο της LRRK2 συμπεριλαμβανομένης και της R1441G.

Στον πληθυσμό αυτό όμως, βρέθηκαν δύο καινούριες μεταλλάξεις: οι A211V και K544E. Το γεγονός αυτό ίσως να υποδηλώνει ότι ειδικές μεταλλάξεις στο γονίδιο LRRK2 βρίσκονται σε συγκεκριμένους πληθυσμούς.

Ο φαινότυπος των ασθενών που φέρουν τις μεταλλάξεις A211V και K544E είναι παρόμοιος με τον φαινότυπο ασθενών με νόσο Parkinson η εμφάνιση της οποίας σχετίζεται με μεταλλάξεις στο γονίδιο LRRK2, καθώς η εμφάνιση της νόσου χαρακτηρίζεται από τρόπο, η ασθένεια εξελίσσεται βραδέως και για τα πρώτα τουλάχιστον χρόνια ανταποκρίνεται καλά στην αγωγή με L-Dopa [68, 69]. Οι μεταλλάξεις αυτές δε βρέθηκαν στους υγιείς μάρτυρες που μελετήθηκαν και είχαν τον ίδιο τόπο καταγωγής και αντίστοιχη ηλικία με τους ασθενείς με οικογενή μορφή της νόσου. Ωστόσο το γεγονός ότι δε κατέστη δυνατόν να απομονωθεί η μετάλλαξη K544E σε ένα άτομο με νόσο Parkinson, που ανήκει στην οικογένεια στην οποία βρέθηκαν τα δύο μέλη φορείς της μετάλλαξης, είναι ενδεικτικό του ότι η μετάλλαξη αυτή είναι καλοήθης ή ότι είναι παθογόνος αλλά η νόσος σε αυτό το άτομο αντιπροσωπεύει ένα φαινοαντίγραφο (με τον ορισμό αυτό χαρακτηρίζουμε ένα φαινότυπο που καθορίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και μιμείται ένα φαινότυπο γονιδιακά καθορισμένο). Αν και το φαινοαντίγραφο αποτελεί ένα σύνηθες φαινόμενο στους ασθενείς φορείς, μεταλλάξεων του γονιδίου LRRK2, [122, 123] θα πρέπει να είμαστε πολύ επιφυλακτικοί στο χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων A211V και K544E ως παθογόνες λόγω των ελλιπών στοιχείων ανάλυσης σύνδεσης που υπάρχουν.

Ένα επιπλέον στοιχείο, το οποίο επιβάλλει να είμαστε επιφυλακτικοί στο να χαρακτηρίσουμε παθογόνες τις μεταλλάξεις αυτές, είναι το γεγονός ότι και οι δύο αντιστοιχούν σε δομικές αλλαγές σε περιοχή της πρωτεΐνης της οποίας η λειτουργία δεν είναι γνωστή. Αν και οι μέχρι τώρα γνωστές μεταλλάξεις στο γονίδιο LRRK2 αντιστοιχούσαν σε σημεία της πρωτεΐνης που βρίσκονταν σε λειτουργικά τμήματα αυτής, οι μεταλλάξεις A211V και K544E είναι οι πρώτες πιθανώς παθογόνες μεταλλάξεις που βρέθηκαν στο αρχικό (heat like) τμήμα της πρωτεΐνης. Αυτό μπορεί να σημαίνει ή ότι ειδικές μεταλλάξεις είναι πιο συχνές σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, ή ότι οι μεταλλάξεις αυτές είναι καλοήθεις και δεν έχουν καμία σχέση με την εμφάνιση της νόσου.

Είναι σαφές ότι περαιτέρω μελέτες θα πρέπει να γίνουν σε μεγάλες οικογένειες με οικογενή μορφή της νόσου του Parkinson, προκειμένου να αποδειχθεί ο παθογόνος ρόλος. Επιπλέον λειτουργικές μελέτες έκφρασης

των μεταλλάξεων αυτών θα μας διαφωτίσουν για τον πιθανά παθογόνο ρόλο τους.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Gasser, T., *Genetics of Parkinson's disease*. J Neurol, 2001. **248**(10): p. 833-40.
2. Siderowf, A., *Parkinson's disease: clinical features, epidemiology and genetics*. Neurol Clin, 2001. **19**(3): p. 565-78, vi.
3. Dick, F.D., et al., *Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study*. Occup Environ Med, 2007. **64**(10): p. 666-72.
4. Cookson, M.R., G. Xiomerisiou, and A. Singleton, *How genetics research in Parkinson's disease is enhancing understanding of the common idiopathic forms of the disease*. Curr Opin Neurol, 2005. **18**(6): p. 706-11.
5. Xiomerisiou, G., et al., *Genetic basis of Parkinson disease*. Neurosurg Focus. **28**(1): p. E7.
6. Goedert, M., *Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(7): p. 492-501.
7. Giasson, B.I., et al., *Mutant and wild type human alpha-synucleins assemble into elongated filaments with distinct morphologies in vitro*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7619-22.
8. Conway, K.A., J.D. Harper, and P.T. Lansbury, *Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease*. Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1318-20.
9. Ueda, K., et al., *Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 11282-6.
10. Polymeropoulos, M.H., et al., *Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease*. Science, 1997. **276**(5321): p. 2045-7.
11. Papadimitriou, A., et al., *Mutated alpha-synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance?* Neurology, 1999. **52**(3): p. 651-4.
12. Spillantini, M.G., et al., *Alpha-synuclein in Lewy bodies*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 839-40.
13. Dauer, W. and S. Przedborski, *Parkinson's disease: mechanisms and models*. Neuron, 2003. **39**(6): p. 889-909.
14. Kruger, R., et al., *Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Nat Genet, 1998. **18**(2): p. 106-8.
15. Zarranz, J.J., et al., *The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia*. Ann Neurol, 2004. **55**(2): p. 164-73.

16. Singleton, A.B., et al., *alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease*. Science, 2003. **302**(5646): p. 841.
17. Chartier-Harlin, M.C., et al., *Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease*. Lancet, 2004. **364**(9440): p. 1167-9.
18. Ibanez, P., et al., *Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease*. Lancet, 2004. **364**(9440): p. 1169-71.
19. Golbe, L.I., et al., *Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred*. Ann Neurol, 1996. **40**(5): p. 767-75.
20. West, A., et al., *Identification and characterization of the human parkin gene promoter*. J Neurochem, 2001. **78**(5): p. 1146-52.
21. Pals, P., et al., *alpha-Synuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2004. **56**(4): p. 591-5.
22. Cuervo, A.M., et al., *Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy*. Science, 2004. **305**(5688): p. 1292-5.
23. Chandra, S., et al., *Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14966-71.
24. Chan, P., et al., *Failure to find the alpha-synuclein gene missense mutation (G209A) in 100 patients with younger onset Parkinson's disease*. Neurology, 1998. **50**(2): p. 513-4.
25. Gasser, T., et al., *Genetic complexity and Parkinson's disease*. Science, 1997. **277**(5324): p. 388-9; author reply 389.
26. Parsian, A., et al., *Mutation, sequence analysis, and association studies of alpha-synuclein in Parkinson's disease*. Neurology, 1998. **51**(6): p. 1757-9.
27. Scott, W.K., et al., *Genetic complexity and Parkinson's disease. Deane Laboratory Parkinson Disease Research Group*. Science, 1997. **277**(5324): p. 387-8; author reply 389.
28. Vaughan, J., et al., *The alpha-synuclein Ala53Thr mutation is not a common cause of familial Parkinson's disease: a study of 230 European cases. European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease*. Ann Neurol, 1998. **44**(2): p. 270-3.
29. Vaughan, J.R., et al., *Sequencing of the alpha-synuclein gene in a large series of cases of familial Parkinson's disease fails to reveal any further mutations. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease (GSPD)*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(4): p. 751-3.
30. Warner, T.T. and A.H. Schapira, *The role of the alpha-synuclein gene mutation in patients with sporadic Parkinson's disease in the*

- United Kingdom. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1998. **65**(3): p. 378-9.
31. Takahashi, H., et al., *Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathologic study in a family*. *Neurology*, 1994. **44**(3 Pt 1): p. 437-41.
 32. Mori, H., et al., *Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q*. *Neurology*, 1998. **51**(3): p. 890-2.
 33. Farrer, M., et al., *Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations*. *Ann Neurol*, 2001. **50**(3): p. 293-300.
 34. Hattori, N., et al., *Molecular genetic analysis of a novel Parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the Parkin gene in affected individuals*. *Ann Neurol*, 1998. **44**(6): p. 935-41.
 35. Abbas, N., et al., *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*, 1999. **8**(4): p. 567-74.
 36. Klein, C., et al., *Parkin deletions in a family with adult-onset, tremor-dominant parkinsonism: expanding the phenotype*. *Ann Neurol*, 2000. **48**(1): p. 65-71.
 37. Kann, M., et al., *Role of parkin mutations in 111 community-based patients with early-onset parkinsonism*. *Ann Neurol*, 2002. **51**(5): p. 621-5.
 38. Khan, N.L., et al., *Parkin disease: a phenotypic study of a large case series*. *Brain*, 2003. **126**(Pt 6): p. 1279-92.
 39. Hedrich, K., et al., *Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies*. *Mov Disord*, 2004. **19**(10): p. 1146-57.
 40. Zhang, Y., et al., *Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(24): p. 13354-9.
 41. Shimura, H., et al., *Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase*. *Nat Genet*, 2000. **25**(3): p. 302-5.
 42. Kitada, T., et al., *Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism*. *Nature*, 1998. **392**(6676): p. 605-8.
 43. Feany, M.B. and L.J. Pallanck, *Parkin: a multipurpose neuroprotective agent?* *Neuron*, 2003. **38**(1): p. 13-6.

44. Gasser, T., et al., *A susceptibility locus for Parkinson's disease maps to chromosome 2p13*. Nat Genet, 1998. **18**(3): p. 262-5.
45. Leroy, E., et al., *The ubiquitin pathway in Parkinson's disease*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 451-2.
46. Valente, E.M., et al., *Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1*. Science, 2004. **304**(5674): p. 1158-60.
47. Valente, E.M., et al., *Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36*. Am J Hum Genet, 2001. **68**(4): p. 895-900.
48. Valente, E.M., et al., *PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism*. Ann Neurol, 2004. **56**(3): p. 336-41.
49. Gandhi, S., et al., *PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease*. Brain, 2006. **129**(Pt 7): p. 1720-31.
50. Leutenegger, A.L., et al., *Juvenile-onset Parkinsonism as a result of the first mutation in the adenosine triphosphate orientation domain of PINK1*. Arch Neurol, 2006. **63**(9): p. 1257-61.
51. Beilina, A., et al., *Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(16): p. 5703-8.
52. Hatano, Y., et al., *Novel PINK1 mutations in early-onset parkinsonism*. Ann Neurol, 2004. **56**(3): p. 424-7.
53. Rogaeva, E., et al., *Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease*. Arch Neurol, 2004. **61**(12): p. 1898-904.
54. Rohe, C.F., et al., *Homozygous PINK1 C-terminus mutation causing early-onset parkinsonism*. Ann Neurol, 2004. **56**(3): p. 427-31.
55. van Duijn, C.M., et al., *Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(3): p. 629-34.
56. Dekker, M., et al., *Clinical features and neuroimaging of PARK7-linked parkinsonism*. Mov Disord, 2003. **18**(7): p. 751-7.
57. Dekker, M.C., et al., *Brachydactyly and short stature in a kindred with early-onset parkinsonism*. Am J Med Genet A, 2004. **130A**(1): p. 102-4.
58. Bonifati, V., et al., *Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism*. Science, 2003. **299**(5604): p. 256-9.

59. Nagakubo, D., et al., *DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **231**(2): p. 509-13.
60. Bandopadhyay, R., et al., *The expression of DJ-1 (PARK7) in normal human CNS and idiopathic Parkinson's disease*. Brain, 2004. **127**(Pt 2): p. 420-30.
61. Zhang, L., et al., *Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(14): p. 2063-73.
62. Canet-Aviles, R.M., et al., *The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 9103-8.
63. Abou-Sleiman, P.M., et al., *The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2003. **54**(3): p. 283-6.
64. Moore, D.J., et al., *Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(1): p. 71-84.
65. Hague, S., et al., *Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation*. Ann Neurol, 2003. **54**(2): p. 271-4.
66. Hering, R., et al., *Novel homozygous p.E64D mutation in DJ1 in early onset Parkinson disease (PARK7)*. Hum Mutat, 2004. **24**(4): p. 321-9.
67. Hedrich, K., et al., *DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease*. Neurology, 2004. **62**(3): p. 389-94.
68. Zimprich, A., et al., *Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology*. Neuron, 2004. **44**(4): p. 601-7.
69. Paisan-Ruiz, C., et al., *Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease*. Neuron, 2004. **44**(4): p. 595-600.
70. Bosgraaf, L. and P.J. Van Haastert, *Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1643**(1-3): p. 5-10.
71. Funayama, M., et al., *A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1*. Ann Neurol, 2002. **51**(3): p. 296-301.
72. Gloeckner, C.J., et al., *The Parkinson disease causing LRRK2 mutation I2020T is associated with increased kinase activity*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(2): p. 223-32.

73. West, A.B., et al., *Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(46): p. 16842-7.
74. Korr, D., et al., *LRRK1 protein kinase activity is stimulated upon binding of GTP to its Roc domain*. Cell Signal, 2006. **18**(6): p. 910-20.
75. Nolen, B., S. Taylor, and G. Ghosh, *Regulation of protein kinases; controlling activity through activation segment conformation*. Mol Cell, 2004. **15**(5): p. 661-75.
76. Kachergus, J., et al., *Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(4): p. 672-80.
77. Correia Guedes, L., et al., *Worldwide frequency of G2019S LRRK2 mutation in Parkinson's disease: A systematic review*. Parkinsonism Relat Disord, 2009.
78. Change, N., G. Mercier, and G. Lucotte, *Genetic screening of the G2019S mutation of the LRRK2 gene in Southwest European, North African, and Sephardic Jewish subjects*. Genet Test, 2008. **12**(3): p. 333-9.
79. Xiromerisiou, G., et al., *Screening for SNCA and LRRK2 mutations in Greek sporadic and autosomal dominant Parkinson's disease: identification of two novel LRRK2 variants*. Eur J Neurol, 2007. **14**(1): p. 7-11.
80. Wszolek, Z.K., et al., *German-Canadian family (family A) with parkinsonism, amyotrophy, and dementia - Longitudinal observations*. Parkinsonism Relat Disord, 1997. **3**(3): p. 125-39.
81. Hatano, T., et al., *Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(6): p. 678-90.
82. Brown, D.A. and E. London, *Functions of lipid rafts in biological membranes*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 111-36.
83. Biskup, S., et al., *Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain*. Ann Neurol, 2006. **60**(5): p. 557-69.
84. Najim al-Din, A.S., et al., *Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome*. Acta Neurol Scand, 1994. **89**(5): p. 347-52.
85. Ramirez, A., et al., *Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase*. Nat Genet, 2006. **38**(10): p. 1184-91.
86. Hicks, A.A., et al., *A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease*. Ann Neurol, 2002. **52**(5): p. 549-55.

87. Pankratz, N., et al., *Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(20): p. 2599-608.
88. Pankratz, N., et al., *Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(4): p. 1053-7.
89. Strauss, K.M., et al., *Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(15): p. 2099-111.
90. Vande Walle, L., M. Lamkanfi, and P. Vandenabeele, *The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview*. Cell Death Differ, 2008. **15**(3): p. 453-60.
91. Keeney, P.M., et al., *Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled*. J Neurosci, 2006. **26**(19): p. 5256-64.
92. Beal, M.F., *Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration*. Ann Neurol, 2005. **58**(4): p. 495-505.
93. Swerdlow, R.H., et al., *Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease*. Ann Neurol, 1996. **40**(4): p. 663-71.
94. Gorell, J.M., et al., *The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living*. Neurology, 1998. **50**(5): p. 1346-50.
95. Thiruchelvam, M., et al., *The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease*. J Neurosci, 2000. **20**(24): p. 9207-14.
96. Betarbet, R., et al., *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease*. Nat Neurosci, 2000. **3**(12): p. 1301-6.
97. Bender, A., et al., *High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease*. Nat Genet, 2006. **38**(5): p. 515-7.
98. Dexter, D.T., et al., *Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease*. Ann Neurol, 1994. **35**(1): p. 38-44.
99. Chinta, S.J. and J.K. Andersen, *Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: implications for Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med, 2006. **41**(9): p. 1442-8.
100. St-Pierre, J., et al., *Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators*. Cell, 2006. **127**(2): p. 397-408.

101. McGill, J.K. and M.F. Beal, *PGC-1alpha, a new therapeutic target in Huntington's disease?* Cell, 2006. **127**(3): p. 465-8.
102. Martin, L.J., et al., *Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death.* J Neurosci, 2006. **26**(1): p. 41-50.
103. Nieto, M., et al., *Increased sensitivity to MPTP in human alpha-synuclein A30P transgenic mice.* Neurobiol Aging, 2006. **27**(6): p. 848-56.
104. Klivenyi, P., et al., *Mice lacking alpha-synuclein are resistant to mitochondrial toxins.* Neurobiol Dis, 2006. **21**(3): p. 541-8.
105. Darios, F., et al., *Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death.* Hum Mol Genet, 2003. **12**(5): p. 517-26.
106. Kuroda, Y., et al., *Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells.* Hum Mol Genet, 2006. **15**(6): p. 883-95.
107. LaVoie, M.J., et al., *Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin.* Nat Med, 2005. **11**(11): p. 1214-21.
108. Chung, K.K., et al., *S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function.* Science, 2004. **304**(5675): p. 1328-31.
109. Thomas, B. and M.F. Beal, *Parkinson's disease.* Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No. 2**: p. R183-94.
110. Gelb, D.J., E. Oliver, and S. Gilman, *Diagnostic criteria for Parkinson disease.* Arch Neurol, 1999. **56**(1): p. 33-9.
111. Bostantjopoulou, S., et al., *Clinical features of parkinsonian patients with the alpha-synuclein (G209A) mutation.* Mov Disord, 2001. **16**(6): p. 1007-13.
112. Di Fonzo, A., et al., *A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease.* Lancet, 2005. **365**(9457): p. 412-5.
113. Gilks, W.P., et al., *A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease.* Lancet, 2005. **365**(9457): p. 415-6.
114. Nichols, W.C., et al., *Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease.* Lancet, 2005. **365**(9457): p. 410-2.
115. Lesage, S., et al., *G2019S LRRK2 mutation in French and North African families with Parkinson's disease.* Ann Neurol, 2005. **58**(5): p. 784-7.
116. Tan, E.K., et al., *The G2019S LRRK2 mutation is uncommon in an Asian cohort of Parkinson's disease patients.* Neurosci Lett, 2005. **384**(3): p. 327-9.

117. Paisan-Ruiz, C., et al., *LRRK2 gene in Parkinson disease: mutation analysis and case control association study*. Neurology, 2005. **65**(5): p. 696-700.
118. Nichols, W.C., et al., *Evaluation of the role of Nurr1 in a large sample of familial Parkinson's disease*. Mov Disord, 2004. **19**(6): p. 649-55.
119. Papapetropoulos, S., et al., *Re: The G2019S LRRK2 mutation is uncommon amongst Greek patients with familial Parkinson's disease*. Eur J Neurol, 2007. **14**(11): p. e6.
120. Kalinderi, K., et al., *The G2019S LRRK2 mutation is uncommon amongst Greek patients with sporadic Parkinson's disease*. Eur J Neurol, 2007. **14**(10): p. 1088-90.
121. Spanaki, C., H. Latsoudis, and A. Plaitakis, *LRRK2 mutations on Crete: R1441H associated with PD evolving to PSP*. Neurology, 2006. **67**(8): p. 1518-9.
122. Singleton, A.B., *Altered alpha-synuclein homeostasis causing Parkinson's disease: the potential roles of dardarin*. Trends Neurosci, 2005. **28**(8): p. 416-21.
123. Hernandez, D.G., et al., *Clinical and positron emission tomography of Parkinson's disease caused by LRRK2*. Ann Neurol, 2005. **57**(3): p. 453-6.