

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Irena VREČAR

**GENOMIKA PARKINSONOVE BOLEZNI NA
PODROČJU JAVNEGA ZDRAVJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Irena VREČAR

**GENOMIKA PARKINSONOVE BOLEZNI NA PODROČJU
JAVNEGA ZDRAVJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

PUBLIC HEALTH GENOMICS OF PARKINSON DISEASE

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepu Komisije za doktorski študij z dne 19. 12. 2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem studijskem programu Biomedicine, področje genetika. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Borut Peterlin.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Kliničnem inštitutu za medicinsko genetiko Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani.

Mentor: prof. dr. Borut PETERLIN

Komisija za oceno in zagovor

Predsednica: prof. dr. Tanja KUNEJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Zvezdan PIRTOŠEK
Univerzitetni klinični center v Ljubljani, Nevrološka klinika, Klinični oddelek za bolezni živčevja

Član: prof. dr. Daniel PETROVIČ
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za histologijo in embriologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Irena Vrečar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 575.111:616.858(043)=163.6
KG Parkinsonova bolezen/družinska anamneza/genomika/personalizirana medicina
AV VREČAR, Irena, dr.med.
SA PETERLIN, Borut (mentor)
KZ 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Biomedicina, področje Genetika
LI 2015
IN GENOMIKA PARKINSONOVE BOLEZNI NA PODROČJU JAVNEGA ZDRAVJA
TD Doktorska disertacija
OP X, 64 str., 7 pregl., 9 sl., 133 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Cilj javnozdravstvene genomike je integracija genomskega spoznanja v programe za preprečevanje bolezni in izboljšanje javnega zdravja. Učinkovite metode za identifikacijo posameznikov s povečanim tveganjem za razvoj Parkinsonove bolezni (PB) na nivoju splošne populacije ni. V raziskavi smo poskušali z integracijo več genomskega nivojev (družinska anamneza, genomska variabilnost visoko-, srednje- in nizkopenetrantnih variant) prispevati k razumevanju etiologije PB. Analizirali smo družinsko pojavljanje PB in drugih bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah bolnikov s PB, ter prisotnost okoljskih dejavnikov tveganja. Ugotovili smo, da družinska anamneza tako za PB kot za bolezni, ki se ob PB pogosteje sopojavljajo v družinah pomembno prispeva k napovedi tveganja oziroma etiologiji PB, ter izboljša prediktivno vrednost napovednega modela tveganja za PB, zasnovanega na okoljskih dejavnikih tveganja. Z analizo genomske variabilnosti smo pokazali pomemben vpliv mutacij v genu *GBA* na etiologijo bolezni, medtem ko drugih visokopenetrantnih genomske variant v dosedaj poznanih ali pa eventualno novih genih, ki še niso bili povezani s PB, pri družinskih bolnikih s PB nismo ugotovili. Nizkopenetrantne genomske variante ne predstavljajo pomembnega dejavnika tveganja niti posamično niti kot seštevek učinkov posameznih variant in ne pojasnijo družinskega pojavljanja PB. Za oblikovanje učinkovitih presejalnih programov za zgodnjo identifikacijo posameznikov s povečanim tveganjem za PB bo smiselna integracija vseh nivojev genomske obremenjenosti, kot kažejo naši podatki, predvsem družinske pojavnosti in genomske variabilnosti srednjepenetrantnih (in visokopenetrantnih) variant ob upoštevanju znanih dejavnikov okolja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 575.111:616.858(043)=163.6
CX Parkinson disease/family history/genomics/personalized medicine
AU VREČAR, Irena, dr.med.
AA PETERLIN, Borut (supervisor)
PP 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral
Programme in Biomedicine, field Genetics
PY 2015
TI PUBLIC HEALTH GENOMICS OF PARKINSON DISEASE
DT Doctoral Dissertation
NO X, 64 p., 7 tab., 9 fig., 133 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The goal of public health genomics is the application of advances in genomic sciences to improve public health and prevent disease. As for now, there is no efficient public health programme for detecting individuals at risk of Parkinson's disease (PD). We analysed different genomic levels in PD (family history, high, medium and low risk genomic variants) and environmental risk factors as well as their importance for risk prediction for PD. We additionally analyzed family history of several other PD associated disorders in the family. We showed that both family history of PD and family history of associated disorders contribute to risk prediction and etiology of PD. We constructed risk prediction models and showed that predictive capacity of risk model based on environmental risk factors improves with inclusion of data on family history of PD and further improves with inclusion of data on family history of associated disorders: dementia, depression and melanoma. In high risk patients we found important influence of moderate risk genomic variants in *GBA* gene, but no other mutations in known or perhaps new genes, previously not associated with PD. Low risk genomic variants do not represent a significant risk factor in Slovenian patients with PD, neither individually nor by integrating cumulative genetic contribution and do not explain familial aggregation of PD. In order to develop efficient public health screening programmes for early identification of healthy individuals at risk for developing PD, integration of all genomic levels would be needed; as our data shows, that would be particularly family history assessment and genomic variability of middle (and high) penetrant genomic variants, and taking into consideration the known effects of environmental risk factors for PD.

KAZALO VSEBINE

	str
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	4
2 PREGLED OBJAV.....	5
2.1 KLIJIČNE ZNAČILNOSTI PARKINSONOVE BOLEZNI	6
2.2 GENOMSKA VARIABILNOST PRI PARKINSONOVI BOLEZNI	7
2.3 ETIOLOŠKI DEJAVNIKI PRI IDIOPATSKI PARKINSONOVI BOLEZNI	10
2.3.1 Presejalni programi javnega zdravja in napoved tveganja	10
2.3.2 Družinska anamneza	11
2.3.2.1 Družinska pojavnost Parkinsonove bolezni	11
2.3.2.2 Družinska pojavnost bolezni, ki se pogosteje sopojavlja v družinah	12
2.3.3 Vpliv okoljskih dejavnikov tveganja	13
2.3.4 Nizkopenetrantne genomske variante	14
2.3.5 Pomen nizkopenetrantnih genomskeih variant za identifikacijo oseb s povečanim tveganjem za razvoj bolezni	15
2.4 PARKINSONOVA BOLEZEN KOT POSLEDICA VISOKOPENETRANTNIH GENOMSKIH VARIANT	16
2.5 PARKINSONOVA BOLEZEN KOT POSLEDICA SREDNJEPENTRANTNIH GENOMSKIH VARIANT	18
2.6 EKSOMSKO SEKVENCIRANJE	18
2.7 EPIGENETIKA PARKINSONOVE BOLEZNI.....	19
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 POTRDILO ETIČNE KOMISIJE O USTREZNOSTI RAZISKAVE	21

3.2	PREISKOVANCI	21
3.3	ANALIZA ETIOLOŠKIH DEJAVNIKOV PRI IDIOPATSKI PARKINSONOVI BOLEZNI	22
3.3.1	Analiza družinske pojavnosti Parkinsonove bolezni	22
3.3.2	Analiza družinske pojavnosti bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah	23
3.3.3	Vpliv okoljskih dejavnikov tveganja	23
3.3.4	Prispevek družinske anamneze in okoljskih dejavnikov k napovednemu modelu bolezni	23
3.3.5	Analiza izbranih genomskeih variant	24
3.3.5.1	Izolacija DNA	24
3.3.5.2	Izbor genomskeih variant za raziskavo	24
3.3.5.3	Postopek analize genotipov	25
3.3.6	Genetski testi, neposredno ponujeni potrošnikom, in Parkinsonova bolezen	25
3.3.7	Statistična obdelava podatkov	25
3.3.7.1	Deskriptivna statistika	25
3.3.7.2	Napovedni model tveganja	26
3.3.7.3	Statistična analiza genotipov	26
3.4	EKSOMSKO SEKVENCIRANJE PRI DRUŽINSKIH OBЛИKAH PARKINSONOVE BOLEZNI	26
4	REZULTATI	29
4.1	ANALIZA ETIOLOŠKIH DEJAVNIKOV PRI IDIOPATSKI PARKINSONOVI BOLEZNI	29
4.1.1	Analiza družinske pojavnosti	29
4.1.2	Vpliv okoljskih dejavnikov tveganja in družinske anamneze na tveganje za Parkinsonovo bolezen	31
4.1.3	Napovedni model tveganja	33
4.1.4	Analiza izbranih genomskeih variant	34
4.1.5	Pomen nizkopenetrantnih genomskeih variant za identifikacijo oseb s povečanim tveganjem za razvoj bolezni	37
4.1.6	Eksomsko sekvenciranje	38
5	RAZPRAVA	40
5.1	DRUŽINSKA POJAVNOST PARKINSONOVE BOLEZNI	40

5.2	DRUŽINSKA POJAVNOST BOLEZNI, KI SE POGOSTEJE SOPOJAVLJAJO V DRUŽINAH	41
5.3	OKOLJSKI DEJAVNIKI TVEGANJA	43
5.4	NAPOVED TVEGANJA IN PRESEJALNI PROGRAMI V JAVNEM ZDRAVJU	44
5.5	POMEN NIZKOPENETRANTNIH GENOMSKIH VARIANT ZA IDENTIFIKACIJO OSEB S POVEČANIM TVEGANJEM ZA RAZVOJ BOLEZNI	44
5.6	POMEN SREDNJEOPENETRANTNIH IN VISOKOPENETRANTNIH GENOMSKIH VARIANT	45
6	SKLEPI	48
7	POVZETEK	49
7.1	POVZETEK	49
7.2	SUMMARY	51
8	VIRI	53
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Klinični diagnostični kriteriji za Parkinsonovo bolezen (Hughes in sod., 1992: 182–183).....	7
Pregl. 2: Genetski lokusi in geni, vključeni v genetsko klasifikacijo Parkinsonove bolezni (Klein in Westenberger, 2012: 3).....	17
Pregl. 3: Izbrane genomske variante, njihov biotip, frekvence manj pogostega alela, aleli, razmerja obetov in vrednosti p (Lill in sod., 2012: 5).....	24
Pregl. 4: Primerjava izbranih spremenljivk med študijsko in kontrolno skupino	32
Pregl. 5: Vpliv posameznih nizkopenetrantnih genomskeih variant na tveganje za Parkinsonovo bolezen: analiza genotipov	35
Pregl. 6: Vpliv posameznih nizkopenetrantnih genomskeih variant na tveganje za Parkinsonovo bolezen: analiza alelov.....	36
Pregl. 7: Spremembe v genu <i>GBA</i> v populaciji bolnikov z družinsko obliko Parkinsonove bolezni.....	38

KAZALO SLIK

Sl. 1: Shematičen povzetek poznanih etiopatogenetskih mehanizmov in interakcij v dopaminergičnih celicah substantie nigre. Mutacije v genih so povezane z motnjo enega ali več prikazanih sistemov (Obeso in sod., 2010: 654)	5
Sl. 2: Časovni prikaz genetskih odkritij pri Parkinsonovi bolezni (Houlden in Singleton, 2012: 326).....	8
Sl. 3: Predlagana shema za klasifikacijo genomskega variant, povezanih s Parkinsonovo boleznijo, glede na frekvence rizičnih alelov in velikost genetskega učinka (Kumar in sod., 2012a: 471).....	9
Sl. 4: Rodovniki slovenskih družin z visokim tveganjem za Parkinsonovo bolezen	28
Sl. 5: Rodovniki slovenskih družin s srednjim tveganjem za Parkinsonovo bolezen	29
Sl. 6: Primerjava AUC-krivulj za model 1 (okoljski dejavniki tveganja), model 2 (modelu 1 dodana družinska anamneza za Parkinsonovo bolezen) in model 3 (modelu 2 dodana družinska anamneza za bolezni, ki se pogosteje soprojavljajo v družinah).....	33
Sl. 7: Identifikacija genotipov <i>LRRK2</i> rs1491942 po reakciji PCR v realnem času.....	34
Sl. 8: Porazdelitev seštevka števila nizkopenetrantnih genomskega variant pri bolnikih z družinsko obliko Parkinsonove bolezni v primerjavi s sporadičnimi bolniki.....	37
Sl. 9: Delecija prvih petih eksonov v genu <i>GBA</i> pri bolniku z družinsko obliko Parkinsonove bolezni	39

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP13A2	ATPaza tip 13A2, angl. <i>ATPase type 13A2</i>
AUC	področje pod krivuljo, angl. <i>area under the curve</i>
CDC	Center za nadzor bolezni in preventivo, angl. <i>Center for disease control and prevention</i>
CI	interval zaupanja, angl. <i>confidence interval</i>
DNA	deoksiribonukleinska kislina, angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DTC	genetski testi, neposredno ponujeni potrošniku; angl. <i>direct to consumer</i>
ER	endoplazmatski retikulum, angl. <i>endoplasmatic reticulum</i>
GATK	GATK orodje za analizo genoma, angl. <i>Genome Analysis Toolkit</i>
GBA	beta glukozidaza, angl. <i>glucosidase, beta, acid</i>
GWAS	asociacijske analize na ravni celotnega genoma, angl. <i>genome wide association studies</i>
HPO	<i>Human Phenotype Ontology</i>
LRRK2	z levcini bogata kinaza 2, angl. <i>leucine-rich repeat kinase 2</i>
MAF	frekvenca manj pogostega alela, angl. <i>minor allele frequency</i>
MS	multipla skleroza, angl. <i>multiple sclerosis</i>
NGS	sekvenciranje nove generacije, angl. <i>new generation sequencing</i>
OR	razmerje obetov, angl. <i>odds ratio</i>
PB	Parkinsonova bolezen, angl. <i>Parkinson's disease</i>
PCR	verižna reakcija s polimerazo; angl. <i>polymerase chain reaction</i>
qPCR	kvantitativni PCR v realnem času, angl. <i>quantitative PCR</i>
RR	relativno tveganje, angl. <i>relative risk</i>
SD	standardna deviacija, angl. <i>standard deviation</i>
SNCA	alfa sinuklein, angl. <i>synuclein, alpha</i>
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov, angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>

1 UVOD

Parkinsonova bolezen (PB) je druga najpogostejsa nevrodegenerativna bolezen, ki prizadene več kot 3 % starejših od 70 let (Burbulla in Krüger, 2011). Na podlagi objavljenih študij o prevalenci bolezni je bilo leta 2005 v petih zahodnoevropskih in desetih svetovnih državah z največ prebivalci skupno med 4,1 in 4,6 milijona bolnikov s PB, starejših od 50 let; po izračunanih projekcijah naj bi se število bolnikov do leta 2030 podvojilo, in sicer na 8,7–9,3 milijona (Dorsey in sod., 2007). Zaradi staranja prebivalstva in spremljajočega večanja prevalence postaja PB vedno bolj pereč problem na področju javnega zdravja, kar se odraža v številnih iniciativah, ki stremijo k povečanju javne in strokovne prepoznavnosti PB, njene prevalence, z njo povezane invalidnosti in stroškov zdravljenja ter k povečanju števila raziskav na področju zgodnjega odkrivanja in zdravljenja bolezni.

Pomembno vlogo v dejavnosti javnega zdravja predstavlja preprečevanje bolezni preko populacijskega pristopa s ciljem izboljšanja zdravja prebivalstva. Za usmerjeno preventivno delovanje je bistvena identifikacija posameznikov s povečanim tveganjem za nastop bolezni v populaciji. Za nevrodegenerativne bolezni je značilna dolga predklinična faza odmiranja nevronov, preden se bolezen izrazi (PB se pojavi, ko odmre približno 80 % dopaminergičnih nevronov). V predklinični fazi bolezni bi z uvedbo nevroprotективnega zdravljenja lahko delovali preventivno in preprečili nadaljnje odmiranje nevronov (Grunblatt, 2008; Olanow in Obeso, 2012; Savica in sod., 2010).

Kot pomemben genomski pristop za identifikacijo posameznikov s povečanim tveganjem za nastop bolezni je Center za nadzor bolezni in preventivo (CDC, Atlanta) razvil program Family Healthware, ki uporablja oceno družinske anamneze v sklopu strategij za preprečevanje številnih kroničnih nenalezljivih bolezni (rak, bolezni srca in ožilja, diabetes) (CDC, 2014). Podobnega pristopa, ki bi omogočil napoved tveganja za PB v splošni populaciji, še ni, so pa objavljene družinske študije in metaanaliza 29 objavljenih študij o družinski anamnezi za PB pokazale njen povečano pojavnost v družinah bolnikov s PB (Rybicki in sod., 1999; Taylor in sod., 1999; Thacker in Ascherio, 2008).

Poleg pogostejše pojavnosti PB so v družinah bolnikov opisani primeri pogostejšega pojavljanja nekaterih drugih, s PB na videz nepovezanih bolezni. Na osnovi modularnih zgradb bolezni smo postavili hipotezo o pogostejšem sopojavljanju bolezni v družinah. Biološki modul predstavlja produkti določenih genov, ki med seboj interagirajo v določeni poti/modulu (na primer multiproteinski kompleks, celična pot ...) (Oti in Brunner, 2007). Različne bolezni si med seboj biološke module delijo, zato lahko posledično pričakujemo, da se v družinah sopojavljajo pogosteje, kot bi pričakovali. Tako so bili opisani primeri sopojavljanja demence in PB ter melanoma in PB v družinah in večje tveganje za PB pri posameznikih s pozitivno družinsko anamnezo za melanom (Gao in sod., 2009). Z identifikacijo bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah bolnikov s PB, želimo prispevati k izboljšavi strategij za identifikacijo posameznikov s povečanim tveganjem za razvoj bolezni na področju javnega zdravja.

Obstoječi CDC-programi za identifikacijo posameznikov s povečanim tveganjem za nastop kroničnih bolezni ne vključujejo ocene tveganja za PB, poleg tega njihove napovedi temeljijo samo na ocenah družinske anamneze za tisto bolezen, za katero program ocenjuje tveganje. Z našim pristopom želimo združiti družinsko anamnezo za PB z družinsko anamnezo za bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, ter z integracijo dobljenih družinskih podatkov in znanih dejavnikov tveganja celostno pristopiti k napovedi tveganja za PB.

Družinsko anamnezo o PB želimo nadgraditi s podatki o genomske variabilnosti, ki je pri PB vezana po eni strani na doprinos visoko- in srednjepenetrantnih genomske variant z močno napovedno vrednostjo, vpletenih v družinsko obliko bolezni, ter na drugi strani na doprinos nizkopenetrantnih genomske variant, vpletenih v patogenezo pogostejše idiopatske bolezni. Srednjepenetrantne genomske variante se po pomenu in napovedni vrednosti uvrščajo vmes med monogensko in idiopatsko obliko bolezni. Primer je mutacija v genu *GBA*, katere pomen, ki ni povsem pojasnjen, je nekje med srednjepenetrantno genomske varianto in dominantno mutacijo z nepopolno penetrancijo (Anheim in sod., 2012).

Visokopenetrantne genomske variante najdemo pri približno 30 % bolnikov z družinsko obliko PB in približno 5–10 % vseh bolnikov s PB (Klein in Djarmati,

2011). Do sedaj je znanih 15 vzročnih genov, katerih mutacije povzročijo nastop PB (*SNCA*, *LRRK2*, *UCHL1*, *HTRA2*, *PARK2*, *PINK1*, *DJ1*, *ATP13A2*, *PLA2G6*, *FBXO7*, *VPS35*, *EIF4G1*, *DNAJC6*, *SYNJ1*, *DNAJC13*). Ker pomemben delež monogenske oblike PB še ni genetsko pojasnjen (Bras in Singleton, 2011), želimo z metodo eksomskega sekvenciranja ugotoviti morebitne nove gene, vpletene v PB, ter analizirati prispevek znanih visoko- in srednjepenetrantnih genomskeih variant pri slovenski populaciji bolnikov s pomembno družinsko pojavnostjo PB.

Nizkopenetrantne genomske variante so asociacijske študije na ravni celotnega genoma (GWAS) identificirale v skoraj 20 genih, povezanih s povečanim tveganjem za PB (Coppedè, 2012; Lill in sod., 2012; Singleton in sod., 2013). Za nizkopenetrantne variante so značilna nizka razmerja obetov OR (angl. *odds ratio*) in ni povsem jasno, v kakšni meri dejansko prispevajo k napovedi tveganja za razvoj (kompleksnih) bolezni. Ob majhnih individualnih učinkih nizkopenetrantnih genomskeih variant se pojavljajo poizkusi pojasnitve etiologije bolezni preko integracije učinkov večjega števila variant. Z integracijo učinkov več nizkopenetrantnih genomskeih variant so na primeru multiple skleroze (MS) pokazali večje kopičenje analiziranih variant v družinskih oblikah v primerjavi s sporadičnimi oblikami bolezni (Gourraud in sod., 2011). Podobne analize, ki bi pojasnila pogostejše družinsko pojavljanje bolezni, pri PB še ni bilo. Naša raziskava je prva raziskava na področju PB, ki želi ugotoviti, ali lahko z integracijo učinkov posameznih analiziranih nizkopenetrantnih genomskeih variant (skupno genomsko breme) pojasnimo genetsko nagnjenje k PB v družinskih oblikah PB.

Kljub opisani kompleksnosti interpretacije pomena nizkopenetrantnih genomskeih variant in njihovi majhni ter vprašljivi napovedni vrednosti so splošni populaciji tako v Sloveniji kot v tujini na voljo genetski testi, neposredno ponujeni potrošnikom (DTC-testi; angl. *direct-to-consumer*), ki temeljijo na analizah nizkopenetrantnih genomskeih variant. Kljub temu da je stališče stroke do perečega vprašanja vedno bolj razširjenih DTC-genetskih testov v medicinske namene zaradi njihove pomanjkljive klinične vrednosti in uporabnosti zadržano, pa se prakse v različnih državah razlikujejo (Borry in sod., 2012; European Society of Human Genetics, 2010; Howard in Borry, 2012). Ob aktualnosti problematike DTC-testiranja smo v sklopu disertacije opravili raziskavo dostopnosti-DTC storitev v Sloveniji.

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Z integracijo različnih genomskeh pristopov (ocena družinske anamneze, analiza genomske variabilnosti z asociacijsko študijo genomskeih variant in eksomskim sekvenciranjem) želimo prispevati k celovitejši identifikaciji vloge genomskeih dejavnikov pri Parkinsonovi bolezni in morebitni uporabi genomskeih dejavnikov za identifikacijo oseb s povečanim tveganjem za razvoj Parkinsonove bolezni.

Preverili smo naslednje hipoteze:

Hipoteza 1: Analiza družinske pojavnosti Parkinsonove bolezni in analiza pojavnosti bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, predstavljata pomembno orodje za identifikacijo oseb s povečanim genetskim tveganjem za pojav Parkinsonove bolezni.

Hipoteza 2: Analiza pojavnosti nizkopenetrantnih genomskeih variant pripomore k pojasnitvi genetske nagnjenosti k Parkinsonovi bolezni v družinah s pozitivno družinsko anamnezo.

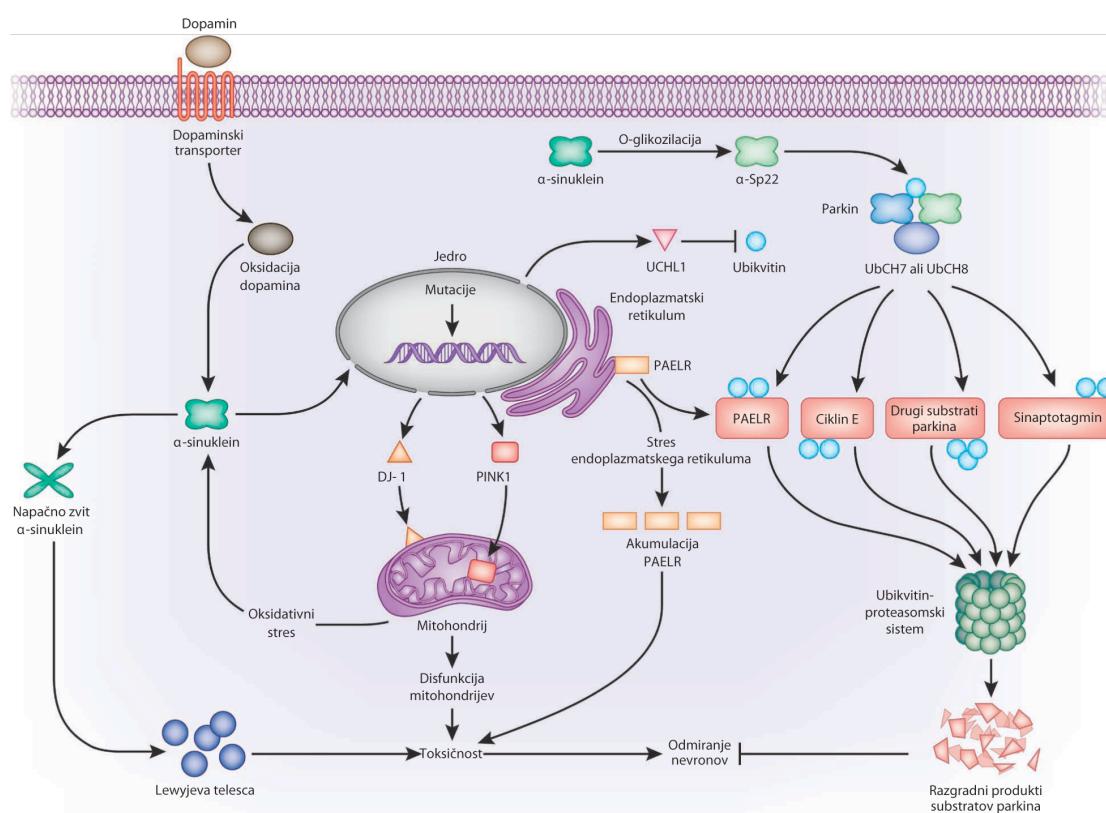
Hipoteza 3: Pri družinskih oblikah Parkinsonove bolezni lahko z metodo sekvenciranja eksoma identificiramo poznane visoko- in srednjepenetrantne variante ter nove gene oziroma mehanizme, odgovorne za pojav Parkinsonove bolezni.

Za dokaz teh hipotez smo si zastavili cilje:

- Pri bolnikih in kontrolni skupini analizirati prisotnost okoljskih dejavnikov tveganja ter družinsko pojavnost PB in bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah. Z dobljenimi podatki oblikovati napovedni model tveganja.
- Analizirati napovedno vrednost nizkopenetrantnih genomskeih variant in z integracijo učinkov posameznih variant pojasniti družinsko pojavnost PB.
- Z eksomskim sekvenciranjem oceniti delež visoko- in srednjepenetrantnih genomskeih sprememb v populaciji slovenskih bolnikov s pomembno družinsko pojavnostjo PB in ugotoviti morebitne nove gene za PB.

2 PREGLED OBJAV

Parkinsonova bolezen (PB) je napredajoča neozdravljiva degenerativna bolezen centralnega živčevja. Razlog za nastop bolezni je propad dopaminergičnih in nedopaminergičnih živčnih celic v možganih bolnikov s PB. Propad dopaminergičnih nevronov v bazalnih ganglijih (substantii nigri) vodi v zmanjšanje koncentracije nevrotransmiterja dopamina in pojav motoričnih znakov PB. V patogenezo propada živčnih celic so vpleteni motena razgradnja proteinov (preko ubikvitin-proteasomskega in autofagno-lizosomskega sistema), patološko kopičenje alfa sinukleina znotraj celic, disfunkcija mitohondrijev ter posledična energetska deplecija zaradi povečanega oksidativnega stresa, vnetje in drugi patološki mehanizmi (Burbulla in Krüger, 2011; Obeso in sod., 2010) (Slika 1).



Slika 1: Shematičen povzetek poznanih etiopatogenetskih mehanizmov in interakcij v dopaminergičnih celicah substantie nigre. Mutacije v genih so povezane z motnjo enega ali več prikazanih sistemov

(Obeso in sod., 2010: 654)

2.1 KLINIČNE ZNAČILNOSTI PARKINSONOVE BOLEZNI

Poglavitne motorične simptome, značilne za PB, povzema kratica TRAP: tremor v mirovanju, rigidnost, akinezija (ali bradikinezija) in posturalna nestabilnost. Bolezen je prvi opisal James Parkinson leta 1817 v svojem eseju *An Essay on the shaking palsy*. Termin *shaking palsy* ozziroma *paralysis agitans* opisuje nehotne tresoče gibe ob hkratnem zmanjšanju mišične moči, zlasti v mirovanju. Med klasične značilnosti parkinsonizma se uvrščajo tudi značilna sprememba drže in motorične blokade (Jankovic, 2008). Nemotorični simptomi PB vključujejo motnje avtonomnega živčevja, nevropsihiatrične težave ter motnje spanja in senzorike. Med motnje senzorike pri PB spadajo slabši voh (hiposmija), parestezije in bolečine. Nemotorični simptomi so lahko prisotni že v času postavitve diagnoze ali pa se pojavijo pred začetkom motoričnih težav (Savica in sod., 2010). Pri približno 20 % vseh bolnikov se sčasoma pojavi demenca. Zdravljenje PB je simptomatsko in temelji pretežno na nadomeščanju dopamina, pomanjkanje katerega je odgovorno za simptome bolezni.

PB se praviloma pojavi po 60. letu starosti, vendar pa vsak deseti bolnik zboli že pred svojim 50. letom; delež moških bolnikov je nekoliko višji od deleža obolelih žensk. Ob pojavi bolezni pred 20. letom starosti gre za juvenilno obliko PB, pri začetku bolezni pred 50. letom pa za PB z zgodnjim začetkom bolezni. Ob začetku bolezni po 50. letu starosti govorimo o PB s poznim začetkom bolezni.

Za namen postavitve diagnoze so veljavni kriteriji Brain Bank Queen Square iz leta 1992, predstavljeni v Preglednici 1 (Hughes in sod., 1992). Zdravnik nevrolog postavi diagnozo na podlagi natančne anamneze težav ter nevrološkega pregleda bolnika. Za PB je značilen enostranski pojav tremorja, dober odziv na zdravljenje z levodopo in odsotnost atipičnih simptomov. Pri postavitvi diagnoze pomaga tudi farmakološka (test z levodopo, apomorfinsko in biperidensko testiranje) in slikovna diagnostika, predvsem SPECT-DAT Scan (Dopamine Transporter Scan), ki prikaže presinaptično pomanjkanje dopamina v bazalnih ganglijih. Dokončna diagnoza PB je postavljena z nevropatološko preiskavo po smrti bolnika.

Preglednica 1: Klinični diagnostični kriteriji za Parkinsonovo bolezen (Hughes in sod., 1992: 182–183)

Klinični diagnostični kriteriji za Parkinsonovo bolezen

1. Diagnoza parkinsonskega sindroma

- bradikinezija
- vsaj eno od sledečega
 - mišična rigidnost
 - 4–6Hz tremor v mirovanju
 - posturalne motnje, ki niso povzročene s primarno vizualno, vestibularno, cerebelarno ali proprioceptivno disfunkcijo

2. Izključitev drugih vzrokov parkinsonizma

3. Prisotnost vsaj treh od naslednjih suportivnih kriterijev

- unilateralen začetek
 - tremor v mirovanju
 - progresiven potek
 - perzistentna asimetrija, ki vztraja pretežno na strani začetka simptomov
 - dober odziv na levodopo (70–100 %)
 - huda z levodopo inducirana horeja
 - odziv na levodopo, ki traja 5 let in več
 - klinični potek 10 let in več
-

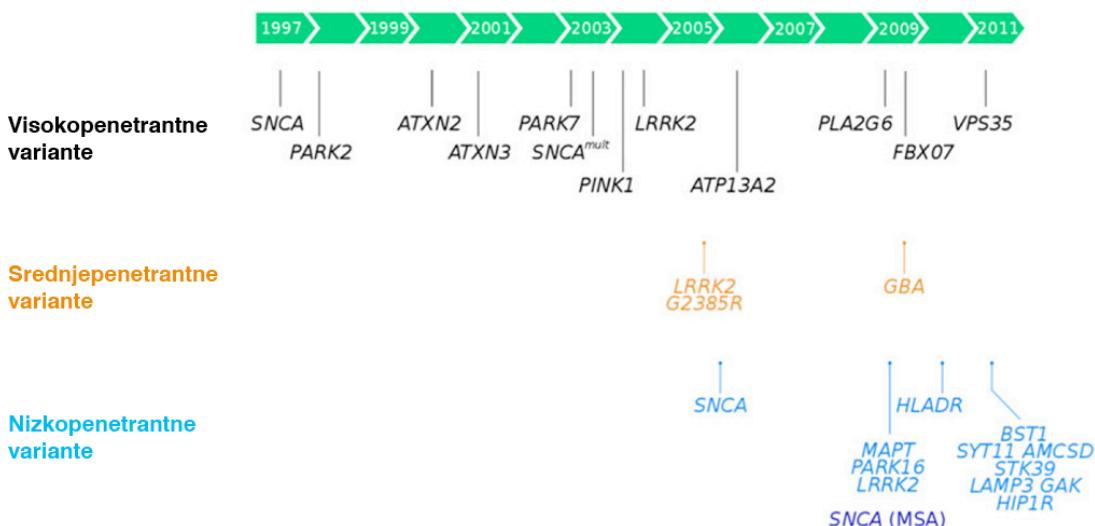
2.2 GENOMSKA VARIABILNOST PRI PARKINSONOVI BOLEZNI

Genetska raznolikost predstavlja osnovo za fenotipsko raznolikost med ljudmi, ki se med drugim kaže kot različna obolenost ali nagnjenost k razvoju določene bolezni. Vključuje vse razlike v zaporedju nukleotidov med posamezniki: mutacije in polimorfizme (Cooper in sod., 2015).

Genetske raziskave zadnjih 15 let so bistveno spremenile razumevanje patogenetskih mehanizmov PB ter preko disekcije vpleteneh molekularnih poti pokazale na skupne etiološke mehanizme monogenske in idiopatske oblike bolezni (Martin in sod., 2011). Z monogensko obliko PB, ki je prisotna pri 5–10 % vseh bolnikov, je po dosedanjih raziskavah povezanih 21 genomskeh lokusov (od tega 15 opredeljenih genov); študije GWAS pa kažejo na pomen nizkopenetrantnih genomskeh variant v teh genih za idiopatsko obliko PB (Corti in sod., 2011). Vsaj nekatere od nevrodegenerativnih poti,

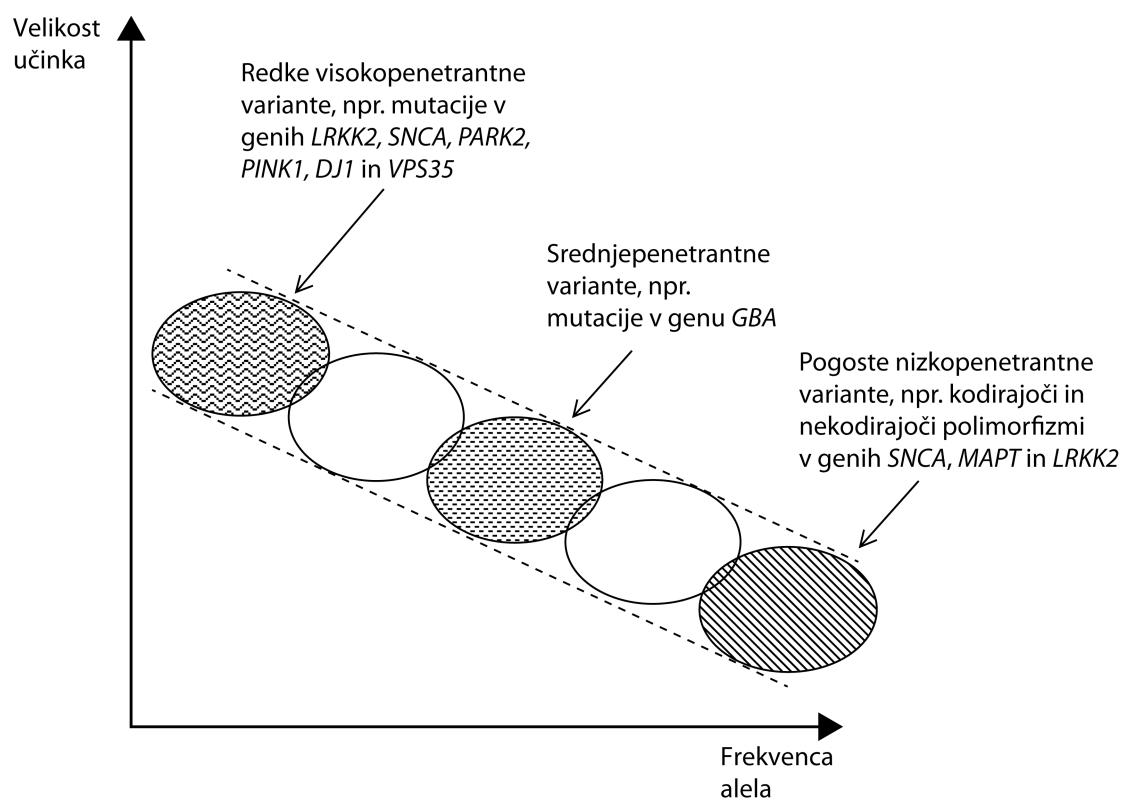
vpletenih v monogensko PB, so udeležene tudi v etiologijo idiopatske PB, kar se kaže v povečanem tveganju za PB pri nosilcih nizkopenetrantnih genomskeih variant v teh genih. Disfunkcija mitohondrijev je poglavitnega pomena pri klinično podobnih, avtosomno recessivnih oblikah PB z zgodnjim začetkom (*PARK2*, *PINK1* in *DJ-1*), akumulacija alfa sinukleina in Lewyjevih teles pa opredeljuje spekter sporadičnih in avtosomno dominantnih oblik, povezanih z mutacijami v genih *SNCA* in *LRRK2* (Corti in sod., 2011).

Genetske raziskave PB so vodile preko identifikacije visokopenetrantnih genomskeih variant (mutacij) pri monogenski PB do odkritja bolj pogostih srednjepenetrantnih variant in nazadnje do opredelitev (mapiranja) številnih nizkopenetrantnih genomskeih variant (Slika 2) (Houlden in Singleton, 2012).



Slika 2: Časovni prikaz genetskih odkritij pri Parkinsonovi bolezni (prikaz glede na čas, ko je bil pomen variante potrjen (Houlden in Singleton, 2012: 326)

Penetranca pomeni delež posameznikov z določeno mutacijo, ki razvijejo klinične znake bolezni. Popolna penetranca mutacije pomeni, da so klinični znaki bolezni prisotni pri vseh nosilcih mutacije, nepopolna pa, da vsi nosilci mutacije nujno ne razvijejo kliničnih znakov bolezni. Predlagana shema za klasifikacijo učinka genomskeih variant glede na penetranco je prikazana na Sliki 3.



Slika 3: Predlagana shema za klasifikacijo genomskega variant, povezanih s Parkinsonovo bolezni, glede na frekvence rizičnih alelov in velikost genetskega učinka (Kumar in sod., 2012a: 471)

Za večino znanih mutacij pri PB je bila opisana nepopolna oziroma od starosti odvisna penetranca (Crosiers in sod., 2011; Lohmann in Klein, 2008; Tan in Skipper, 2007). Najbolje preučena je penetranca najpogostejše mutacije p.G2019S v genu *LRRK2*, za katero je značilna 51 % penetranca v starosti 50 let in 74 % penetranca v starosti 79 let (Kumar in sod., 2012a). Analize doživljenske penetrance duplikacij v genu *SNCA* so pokazale relativno nizko penetranco (33,3–43,8 %) (Nishioka in sod., 2009, 2006). Nepopolna, od starosti odvisna penetranca je bila opisana tudi pri nosilcih mutacij v genih *VPS35* (Kumar in sod., 2012b) in *GIGYF2* (Lautier in sod., 2008), vendar je zaradi majhnega števila dosedaj opisanih bolnikov ni mogoče oceniti. Variabilna penetranca visokopenetrantnih genomske sprememb otežuje genetsko svetovanje in testiranje ter kaže na vpliv dodatnih genetskih dejavnikov (genska ekspresija, post-transkripcijska regulacija genske ekspresije, interakcija z drugimi geni) oziroma okolja.

Pomen heterozigotnih mutacij v genih za PB ni povsem pojasnjen. Raziskave penetrance pri nosilcih mutacij v genu *GBA* kažejo na možnosti, da gre pri *GBA*

dejansko za dominantni gen z nepopolno penetranco (Anheim in sod., 2012). Heterozigotne mutacije v »recesivnih« genih *PARK2* in *PINK-1* so povezane z 1–25 % penetranco PB, heterozigotne mutacije v »dominantnem« genu *LRRK2* z 30–80 % (Klein in sod., 2007), heterozigotne mutacije v »srednjepenetrantnem« genu *GBA* pa z do 30 % penetranco (Anheim in sod., 2012), kar kaže na širok spekter oziroma kontinuum genomske variabilnosti in implicira obstoj dodatnih, še neodkritih dejavnikov, ki vplivajo na pojav bolezni.

2.3 ETIOLOŠKI DEJAVNIKI PRI IDIOPATSKI PARKINSONOVI BOLEZNI

Trenutno najverjetnejša razлага etiologije pogosteje »idiopatske« oblike bolezni je kompleksna interakcija nizkopenetrantnih genomskeih variant, dejavnikov okolja, interakcij med geni in okoljem, staranja in morda dosedaj neprepoznanih genomskeih variant oziroma dejavnikov (Berg in sod., 2005; Hall in sod., 2013; Thacker in Ascherio, 2008).

2.3.1 Presejalni programi javnega zdravja in napoved tveganja

Nevrodegenerativni proces se pri PB začne veliko let pred pričetkom motoričnih znakov in simptomov. Po prvotnih ocenah se predklinično obdobje prične približno 5–6 let pred začetkom motoričnih simptomov, novejše epidemiološke študije nemotoričnih manifestacij PB kažejo, da se lahko ta faza bolezni začne celo 20 let pred začetkom motoričnih znakov (Savica in sod., 2010). V tej predklinični fazi je pomembna prepoznavna napovednih biooznačevalcev in dejavnikov tveganja, da bi z nevroprotективnim zdravljenjem lahko preprečili nadaljnji propad dopaminergičnih nevronov. Z identifikacijo potencialnih nevropatoloških biooznačevalcev, ki bi omogočili prepoznavo posameznikov s povečanim tveganjem za razvoj PB, se ukvarjajo številne raziskave: *Honolulu-Asia Aging Study* (HAAS), *Prospective Validation of Risk factors for the development of Parkinson Syndromes* (PRIPS), *Parkinson Associated Risk Study* (PARS), *Tübingen evaluation of Risk factors for the Early detection of NeuroDegeneration* (TREND) (Berg in sod., 2012). Opredelitev napovedne vrednosti dejavnikov tveganja in identifikacija ustreznih biooznačevalcev predstavlja osnovo za presejalne programe za oceno tveganja za PB, ki bi bili primerni za uporabo v javnem zdravju (Berg in sod., 2012).

Dosedanji napovedni modeli tveganja za PB so vključevali oceno anamnestičnih (družinska anamneza za PB, prisotnost okoljskih dejavnikov tveganja in zgodnjih nemotoričnih simptomov: slabši voh, avtonomni simptomi, zaspanost in nespečnost, depresija in spremembe osebnosti), in kliničnih dejavnikov tveganja (subtilne motorične motnje, hiposmija, testiranje avtonomnega živčevja, dopaminergično funkcionalno slikanje, genetske analize in nevrološke slikovne preiskave, na primer prikaz povečane hiperehogenosti substantie nigre) (Berg in sod., 2005; Berg in sod., 2013; Stern in Siderowf, 2010; Postuma in Montplaisir 2009).

2.3.2 Družinska anamneza

Družinska anamneza odraža skupne genetske dejavnike ter skupno življenjsko okolje družine, zato je močan napovedni dejavnik tveganja in se že uporablja kot genomska pristop v programih javnega zdravja za oceno tveganja bolezni (Valdez in sod., 2010; Yoon in sod., 2009).

2.3.2.1 Družinska pojavnost Parkinsonove bolezni

Večina študij in metaanaliza prikazujeta povečano tveganje za PB za vse sorodnike v prvem kolenu ne glede na začetek bolezni (Thacker in Ascherio, 2008), medtem ko je kohortna družinska raziskava Mayo (The Mayo Clinic family study) ugotovila povečano tveganje le za sorodnike bolnikov z zgodnjim začetkom bolezni (Rocca in sod., 2004).

Ugotovljena tveganja za sorodnike so razmeroma visoka: Gorell in sod. (2004) so ugotovili razmerje obetov (*odds ratio*) OR 4,46 za sorodnike v prvem in drugem kolenu, Taylor in sod. (1999) OR 6,08 za vse sorodnike, Rybicki in sod. (1999) pa OR 4,2 za sorodnike v prvem in drugem kolenu, pri čemer je bila družinska anamneza pomembnejša pri bolnikih, mlajših od 70 let (OR = 8,8), ter pri moških (OR = 8,1) kot pri ženskah (OR = 2,6). Leta 2008 objavljena metaanaliza je potrdila povečano tveganje za PB ob njeni družinski pojavnosti na podlagi 29 vključenih študij družinske pojavnosti PB (Thacker in Ascherio, 2008). Rybicki in sod. (1999) je v

analizi družinske pojavnosti PB le-to ugotovil pri 16 % bolnikov v primerjavi s 4 % pri kontrolni skupini.

2.3.2.2 Družinska pojavnost bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah

Modularnost patogenetskih mehanizmov kaže na možnost, da si različne bolezni biološke module med seboj delijo, zato lahko pričakujemo, da se v družinah sopojavljajo pogosteje, kot bi pričakovali. Biološki modul sestavljajo produkti določenih genov, ki med seboj interagirajo v določeni patogenetski poti (Oti in Brunner, 2007). Na podlagi modularnosti zgradb bolezni lahko torej predpostavimo, da si bolezni delijo skupne genetske variante, ki povečajo tveganje za te bolezni in posledično pogostejšo pojavnost teh bolezni v družinah. Nekaj raziskav je že pokazalo, da je PB povezana z večjo pojavnostjo nekaterih drugih bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, na primer melanomom, Alzheimerjevo boleznijo/demencami in depresijo.

Družinska sopojavnost melanoma v prvem kolenu sorodstva je bila povezana z večjim tveganjem za PB, neodvisno od prisotnosti okoljskih dejavnikov tveganja (Gao in sod., 2009). Pri bolnikih s PB je večjo prevalenco melanoma potrdilo več epidemioloških študij (Bertoni in sod., 2010; Liu in sod., 2011; Rubjerg in sod., 2012).

V družinah s pozitivno družinsko anamnezo za Alzheimerjevo bolezen in PB je bila dokazana večja pojavnost obeh nevrodegenerativnih bolezni (Rosen in sod., 2007), pri sorojencih bolnikov s PB s pridruženo demenco pa je bilo ugotovljeno večje tveganje za Alzheimerjevo bolezen ($RR = 3,2$) (Marder in sod., 1999). Študija o družinski sopojavnosti depresije, demence in PB je ugotovila nakazano povečano tveganje za bipolarno depresijo pri sorodnikih bolnika s PB (Fahim in sod., 1998).

Preučevano je bilo družinsko sopojavljanje depresije in PB, vendar brez dokončnih zaključkov (Fahim in sod., 1998) kljub pomembni sopojavnosti depresije ob PB (do 40 % bolnikov ima anksiozno depresivno simptomatiko) (Wermuth in Bech, 2006).

Pri bolnikih s PB je sopojavnost bolezni (komorbidnost) nekoliko bolje raziskana. Bolniki s PB imajo manjše tveganje za nastop različnih rakavih bolezni in večje tveganje za nastop melanoma, drugih kožnih rakov in raka dojke (Olsen in sod., 2005). Motnje spanja REM in psihiatrične bolezni so bile povezane s povečanim tveganjem za PB (Wirdefeldt in sod., 2011). Pri bolnikih z diabetesom so nekatere raziskave pokazale povečano tveganje za PB (Hu in sod., 2007; Skeie in sod., 2013; Klimek in sod., 2015), medtem ko metaanaliza (Cereda in sod., 2011) povezave med obema boleznima ni potrdila.

2.3.3 Vpliv okoljskih dejavnikov tveganja

Številne študije so preučevale vpliv okoljskih dejavnikov na razvoj PB. Večina študij je potrdila večje tveganje za PB po dolgotrajni izpostavljenosti pesticidom, herbicidom in težkim kovinam, uživanju studenčnice in mehanskih poškodbah glave, medtem ko je bil za kajenje in uživanje kave ugotovljen nevroprotektiven učinek pred nastopom bolezni (Burbulla in Krüger, 2011; Gao in Hong, 2011; Gorell in sod., 2004; Liu in sod., 2012; Priyadarshi in sod., 2001; Van Maele-Fabry in sod., 2012).

Ponavljajoče se travmatske izgube zavesti in izpostavljenost pesticidom je kot dejavnika tveganja potrdila tudi študija Geoparkinson na približno 1000 bolnikih s parkinsonizmom iz petih evropskih držav (Dick in sod., 2007). Ugotovljeno razmerje obetov za izpostavljenost pesticidom v omenjeni študiji je znašalo OR 1,13 (nizka izpostavljenost proti neizpostavljenosti) in OR 1,41 (primerjava visoke izpostavljenosti in neizpostavljenosti pesticidom). Izguba zavesti (enkrat proti nikoli) je bila povezana z razmerjem obetov OR 1,35; več kot enkrat proti nikoli pa z razmerjem obetov OR 2,53. Uporaba tobaka je delovala zaščitno (OR = 0,50) (Dick in sod., 2007). Podobno kot tobak na zmanjšanje tveganja za nastop PB vpliva uživanje kofeina: razmerje obetov OR 0,75 pri moških in OR 0,60 pri ženskah (Liu in sod., 2012).

Opredelitev medsebojne vloge genomskeih variant in okoljskih dejavnikov tveganja je pomembna za razjasnitve etiopatogeneze PB (Burbulla in Krüger, 2011; Gao in Hong,

2011). Nevroprotektivni učinek kajenja je bil pri nekaterih raziskavah potrjen le pri osebah brez družinske pojavnosti PB (Rybicki in sod., 1999; Allam in sod., 2003).

2.3.4 Nizkopenetrantne genomske variante

Na tveganje za razvoj pogostejše idiopatske oblike PB vplivajo številne nizkopenetrantne genomske variante (Peeraully in Tan, 2012). Genetsko dovzetnost za razvoj PB je preučevalo več kot 800 genetskih asociacijskih študij (Hamza in sod., 2010; Lill in sod., 2012; Ross in sod., 2011; Sharma in sod., 2012; Tan in sod., 2010). Celovit pregled vseh objavljenih študij in metaanaliz je dostopen preko javno dostopne baze podatkov PDGene (Lill in sod., 2012). Do danes je identificiranih približno 16 nizkopenetrantnih genomskeih variant oziroma lokusov (Singleton in sod., 2013).

Nizkopenetrantne genomske variante v genih *SNCA*, *LRRK2* in *MAPT* so splošno priznane in potrjene kot dejavniki tveganja za PB na podlagi študij GWAS in metaanaliz objavljenih raziskav (Coppedè, 2012). Poleg naštetih je sistematična metaanaliza več kot 7 milijonov polimorfizmov, pridobljenih iz študij GWAS in manjših asociacijskih študij, ugotovila še naslednje statistično pomembne genomske lokuse: *BST1*, *HIP1R*, *DGKQ*, *MCCC1*, *SLC41A1*, *STK39*, *RAB25* ter *ITGA8* (Lill in sod., 2012). Individualni učinek vsakega posameznega lokusa je relativno majhen. Tvegani aleli povečujejo tveganje za 1,1–1,4-krat, protektivni aleli pa ga zmanjšujejo za 0,95–0,7-krat. Genetsko tveganje je najverjetneje pogojeno s skupnim genetskim bremenom, ki ga tvorijo vse genomske variante, ki jih posameznik nosi v svojem genetskem zapisu (Singleton in sod., 2013).

Opisane genomske variante so vpletene v sekvenco propada živčnih celic preko deficitov sinaptičnega signaliziranja, motene razgradnje proteinov (preko ubikvitin-proteasomskega in avtofagno-lizosomskega sistema), kopičenja alfa sinukleina znotraj celic, disfunkcije mitohondrijev in drugih patoloških mehanizmov. Protein alfa sinuklein v presinaptičnih terminalih živčnih celic v centralnem živčnem sistemu vpliva na procese eksocitoze ter endocitoze in je vpletten v sproščanje nevrotransmiterjev, vključno z dopaminom. Za PB so značilni agregati alfa sinukleina

v obliki Lewyjevih telesc (Trinh in Farrer, 2013). V procese prenosa signalov preko sinapse je vpletен tudi sinaptotagmin (*SYT11*), ki je hkrati substrat za encim parkin (Glass in sod., 2004; Huynh in sod., 2003). Postsinaptično deluje encim dardarin, zapis za katerega nosi gen *LRRK2* (angl. *leucine-rich repeat kinase 2*) in ki regulira fosforilacijo endofilina A, sproščanje endocitotskih veziklov in polarnost nevronov, hkrati pa je vpletен tudi v fosforilacijo MAPT, procese avtofagije in stabilizacijo mikrotubulov (Trinh in Farrer, 2013). Gen *MAPT* nosi zapis za protein tau, ki je pomemben za stabilizacijo mikrotubulov. Gen *HIP1R* nosi zapis za protein, ki interagira z huntingtinom (angl. *huntingtin interacting protein-1 related*), ki je prav tako vpletен v mehanizme endocitoze in morda vpliva na preživetje celic po z ligandi inducirani endocitozi (UniProt Consortium, 2015). Serin-treoninska kinaza (STK39) je encim, vpletен v mehanizme odziva na celični stres.

2.3.5 Pomen nizkopenetrantnih genomskeih variant za identifikacijo oseb s povečanim tveganjem za razvoj bolezni

V zadnjih letih smo priča pojavu številnih zasebnih podjetij, ki genetske teste prodajajo neposredno uporabnikom preko svetovnega spleta (v svetovnem merilu 23andME, deCODEME, Navigenics in Knome) (Kaye, 2008). Na podlagi objavljenih rezultatov GWAS in drugih študij ponujajo izračun tveganja za številne pogoste bolezni, običajno brez vključitve zdravnika oziroma brez ustreznega procesa genetskega svetovanja, ki bi to storitev spremļjal. Medtem ko Belgija in Anglija dovoljujeta DTC-genetsko testiranje, je v Franciji, Nemčiji, Švici ter na Portugalskem v veljni zakonodaja, ki genetskega testiranja brez ustreznega genetskega svetovanja ne dovoljuje (Borry in sod., 2012). Problematika DTC-storitev leži v vprašljivi klinični vrednosti in uporabnosti ponujenih testov, ki so na voljo brez spremljajočega genetskega svetovanja. Poleg tega DTC-ponudniki ponujajo povsem neprimerno testiranje mladoletnih, kar je v nasprotju z uveljavljenimi strokovnimi smernicami, ki predviedajo genetske preiskave mladoletnih oseb le v primeru obstoja terapevtskih ali preventivnih ukrepov za bolezen, za katero otroka testiramo (Howard in sod., 2011).

V sklopu DTC-testov so na voljo tudi testi za kompleksne nevrološke bolezni (Parkinsonovo bolezen, Alzheimerjevo bolezen, multiplo sklerozo in možgansko kap). DTC-storitve ponudniki ponujajo tudi preko večjih zavarovalnic v Sloveniji.

2.4 PARKINSONOVA BOLEZEN KOT POSLEDICA VISOKOPENETRANTNIH GENOMSKIH VARIANT

Pri približno 5–10 % bolnikov je za pojav PB neposredno odgovorna mutacija v genetskem zapisu (Lill in sod., 2012). Pri bolnikih z zgodnjim začetkom bolezni je delež mutacij višji, ocenjen na približno 17 % (Klein in Djarmati, 2011).

Do sedaj je bilo opredeljenih 21 kromosomalnih lokusov, med njimi pa 15 vzročnih genov, ki so vzrok za družinske oblike PB (Preglednica 2) (Klein in Westenberger, 2012). Mutacije v genih *SNCA*, *LRRK2*, *UCHL1*, *GIGYF2*, *HTRA2*, *EIF4G1* in *DNAJC13* povzročajo avtosomno dominantno obliko PB, mutacije v genih *PARK2*, *PINK1*, *DJ1*, *ATP13A2*, *PLA2G6*, *DNAJC6*, *SYNJI* in *FBX07* pa so vzrok avtosomno recesivne PB. Našteti geni so neposredno vpleteni v procese razgradnje proteinov in vzdrževanja mitohodrijske funkcije, ki sta glavni etiopatogenetski poti nevrodegeneracije pri PB (Kumar in sod., 2012a). Najpogostejši vzrok so mutacije v genu *LRRK2*, ki povzročajo PB s poznim začetkom in tipičnimi kliničnimi znaki.

Preglednica 2: Genetski lokusi in geni, vključeni v genetsko klasifikacijo Parkinsonove bolezni (povzeto po Klein in Westenberger, 2012: 3)

Lokus	Kromosom	Gen	Dedovanje
PARK 1/4	4q21.3	SNCA	AD
PARK 2	6q25.2-27	PARK2	AR
PARK 3	2p13	Ni znan	AD
PARK 5	4p14	UCHL-1	AD
PARK 6	1p35-p36	PINK1	AR
PARK 7	1p36	DJ1	AR
PARK 8	12q12-q13.1	LRRK2	AD
PARK 9	1p36	ATP13A2	AR
PARK 10	1p32	Ni znan	dejavnik tveganja
PARK 11	2q36-37	GIGYF2*	AD
PARK 12	Xq21-25	Ni znan	dejavnik tveganja
PARK 13	2p13.1	HTRA2	AD
PARK 14	22q13.1	PLA2G6	AR
PARK 15	22q11.2-qter	FBXO7	AR
PARK 16	1q32	Ni znan	dejavnik tveganja
PARK 17	16q11.2	VPS35	AD
PARK 18	3q27	EIF4G1	AD
PARK 19	1p31.3	DNAJC6	AR
PARK 20	21q22.11	SYNJI	AR
PARK 21	3q22.1	DNAJC13	AD

AD = avtosomno dominantno, AR = avtosomno recesivno dedovanje

* mutacija v genu po prvem opisu 2002 ni bila več ugotovljena (neodvisno potrjena)

2.5 PARKINSONOVA BOLEZEN KOT POSLEDICA SREDNJEPENETRANTNIH GENOMSKIH VARIANT

Gen *GBA* nosi zapis za encim beta glukocerebrozidazo, ki je vpletena v metabolizem glikolipidov v lizosomih. Homozigotne mutacije v tem genu povzročajo Gaucherjevo bolezen, heterozigotne mutacije pa predstavljajo pomemben dejavnik tveganja za PB (srednjepenetrantna genomska varianta). Povezava med PB in Gaucherjevo boleznijo je bila izpeljana iz opažanj, da imajo bolniki z Gaucherjevo boleznijo in njihovi sorodniki, ki so nosilci heterozigotne mutacije v genu *GBA*, večje tveganje za nastop PB (Houlden in Singleton, 2012). Obsežna metaanaliza je pokazala, da heterozigotna mutacija v genu *GBA* približno 5-krat poveča tveganje za PB (Sidransky in sod., 2009). Spremembe v genu *GBA* naj bi bile prisotne pri kar 5–10 % vseh bolnikov s PB, kar številčno predstavlja najpomembnejši genetski napovedni dejavnik tveganja do sedaj (Beavan in Schapira, 2013). PB, povezana z mutacijami v genu *GBA*, je po kliničnem poteku podobna poteku idiopatske PB, lahko pa je povezana z zgodnejšim nastopom bolezni, atipičnimi manifestacijami, s kognitivnim upadom in bolj pogosto s pozitivno družinsko anamnezo (Sidransky in sod., 2009; Swan in Saunders-Pullman, 2013).

2.6 EKSOMSKO SEKVENCIRANJE

Eksomsko sekvenciranje je preiskava, ki omogoča določitev zaporedja ključnih regij celotnega nabora genov v človeškem genomu v eni preiskavi in temelji na metodah sekvenciranja nove generacije (NGS). Kot nova metoda se uporablja za ugotavljanje genetske podlage pri boleznih, pri katerih klasične metode odkrivanja genov niso bile uspešne (Bamshad in sod., 2011). Metoda NGS je omogočila prepoznavo vzročnih genov v prej neopredeljenih genetskih boleznih (npr. sindrom Freeman-Sheldon, Miller, Kabuki) in identifikacijo novih variant pri sporadičnih primerih (Ku in sod., 2011). V dveh neodvisnih raziskavah je bila s to metodo odkrita nova mutacija v genu za vakuolarni sortirajoči protein 35 (angl. *vacuolar protein sorting 35 homolog*) *VPS35* kot vzrok avtosomno dominantne oblike PB (Kumar in sod., 2012a).

Bras in Singleton (2011) sta objavila pregled uporabnosti in morebitnih težav pri aplikaciji eksomskega sekvenciranja na PB. Rezultat analize vsakega eksoma v

povprečju vsebuje približno 2000 novih genetskih variant, med katerimi je treba poiskati vzročno mutacijo. Zaradi relativne pogostnosti PB in visoke frekvence prenašalcev je treba pri analizi rezultatov paziti na morebitno prisotnost heterozigotnih variant v bazi dbSNP (ista varianta je lahko v homozigotni obliki patološka) (Bras in Singleton, 2011).

Postopek sekvenciranja nove generacije vključuje sintezo knjižnice DNA-fragmentov, na kateri izvedemo štiribarvno ciklično reverzibilno terminacijsko reakcijo, pri kateri se posamezni, komplementarni, različno fluorescentno označeni nukleotid veže na tarčno DNA-molekulo. Nevezane označene nukleotide se spere in nato sledi prikaz ter naknadni cepitveni korak, ki odstrani fluorescentno označeno probo in terminator, s čimer se regenerira 3'-OH skupina tarčne sekvence. Cikel se nato ponovi (Metzker, 2010). Z omenjeno preiskavo pridobimo obsežne količine podatkov na nivoju celotnega človeškega genoma, kar zahteva posebne pristope bioinformacijske računalniške analize. Obsežna analiza sekvenčnih podatkov vključuje primerjavo z referenčno sekvenco ter določitev ustreznih filtrov, ki omogočijo zmanjšanje števila najdenih mutacij vsakega vzorca s približno 20000 na okoli 5000 (Ng in sod., 2010). S pomočjo bioinformacijskih orodij nato poiščemo mutacijo ali mutacije, ki bi lahko bile vzrok za bolezen. To vključuje razlikovanje med benignimi in patološkimi variantami, ugotavljanje mutacij v genih, napovedovanje spremembe aminokislinskega zaporedja in posledične strukturne spremembe same beljakovine ter ugotavljanje, kako te spremembe vplivajo na njeno funkcijo.

Metoda eksomskega sekvenciranja ne omogoča zajetja regulatornih ali evolucijsko ohranjenih zaporedij v nekodirajočih regijah genoma, kot tudi ne omogoča celovitega pokritja vseh eksonov (Ku in sod., 2011).

2.7 EPIGENETIKA PARKINSONOVE BOLEZNI

Epigenetika preučuje dedne spremembe v izražanju genov, ki niso povezane s spremembami v kodirajočem zaporedju DNA, in so potencialno reverzibilne. Najpomembnejši epigenetski procesi vključujejo metilacijo DNA, modifikacije

kromatina (acetilacija, ubikvitinilacija in fosforilacija histonskih proteinov) in uravnavanje izražanja preko nekodirajočih RNA, na primer mikro RNA (miRNA).

Pomen epigenetskih modifikacij za procese nevrodegeneracije je bil sprva prikazan pri bolnikih z Alzheimerjevo boleznijo, nekaj študij pa je že pokazalo tudi na pomen epigenetskih vplivov na regulacijo izražanja genov, povezanih s PB (Coppedè, 2012). Dejavniki okolja kot so težke kovine in vnos folatov lahko preko epigenetskih mehanizmov vplivajo na izražanje nevrodegenerativnih genov in tako sprožijo oziroma pospešijo nastanek nevrodegenerativnih bolezni (Kwok, 2010).

Za dokončno razumevanje patogeneze PB bo pomembno tudi razumevanje regulacije molekul miRNA, katerih mehanizmi so glede na več objavljenih raziskav vpleteni v funkcijo dopaminergičnih nevronov in patogenezo PB (Coppedè, 2012).

V teku so številne raziskave terapevtskega potenciala epigenetskih molekul za preprečevanje nevrodegenerativnih bolezni. Preliminarni rezultati celičnih kultur in študij transgenih živalskih modelov so obetavni in kažejo na pomemben zaščitni učinek pan-epigenetskih zdravil proti pogostim nevrodegenerativnim boleznim.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POTRDILO ETIČNE KOMISIJE O USTREZNOSTI RAZISKAVE

Raziskava je bila odobrena s strani Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. 98/12/10). Vsi sodelujoči so podpisali privolitveno soglasje za sodelovanje v raziskavi.

3.2 PREISKOVANCI

K naši raziskavi smo povabili bolnike s PB, ki so bili v obdobju od novembra 2010 do junija 2013 pregledani v ambulanti za ekstrapiramidne bolezni Nevrološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana oziroma so bili v tem času hospitalizirani na Kliničnem oddelku za bolezni živčevja Nevrološke klinike UKC Ljubljana. Dodatno smo bolnike privabili k sodelovanju s pomočjo društva bolnikov s parkinsonizmom Trepetlika in z udeležbo na njihovih rednih srečanjih. Vključitveni kriterij za našo raziskavo je bila s strani nevrologa postavljena diagnoza idiopatske PB (vsi bolniki so izpolnjevali diagnostične kriterije UK PD Society Brain Bank). V raziskavo smo vključili 192 bolnikov s PB. V časovnem obdobju od novembra 2010 do junija 2012 smo v kontrolno skupino vključili zdrave posameznike iz ambulant medicine dela, prometa in športa. V analizo družinske pojavnosti bolezni in okoljskih dejavnikov tveganja je bilo vključenih 192 bolnikov in 1659 zdravih kontrolnih preiskovancev.

Vzorce krvi smo pridobili od 154 bolnikov, vključenih v raziskavo družinske pojavnosti PB. Poleg teh smo v sodelovanju z nevrološko klinikijo dobili še dodatne vzorce DNA 31 bolnikov s pozitivno družinsko anamnezo za PB. Za namen genotipizacije nizkopenetrantnih genomskeh variant smo izbrali 186 zdravih posameznikov, po starosti primerljivih študijski skupini in brez družinske pojavnosti PB. Pri izbrani populaciji 20 bolnikov, ki so izpolnjevali kriterije za monogensko PB (ugotovljeno visoko tveganje, pozitivna družinska anamneza v prvem kolenu ali zgodnji začetek bolezni), smo opravili eksomsko sekvenciranje.

Z metodo pisnega anketiranja smo zbrali demografske podatke o preiskovancih in podatke o družinski pojavnosti PB (število bolnih sorodnikov, starost ob postavljeni diagnozi, sorodstveni odnos) ter bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah. Družinsko anamnezo smo ocenili kot pozitivno, kadar je bila bolezen prisotna pri vsaj enem sorodniku v prvem ali drugem kolenu sorodstva. Poročanje o pozitivni družinski anamnezi smo poskušali vedno, ko je bilo to le mogoče, preveriti s podvprašanji o postavljeni diagnozi bolezni s strani zdravnika (za pozitivno družinsko anamnezo o depresiji je bilo potrebno, da je bila diagnoza depresija postavljena s strani zdravnika). V vprašalnik smo vključili tudi podatke o morebitni izpostavljenosti znamim okoljskim dejavnikom tveganja za PB. Usmerjeno smo spraševali po dolgotrajnejši izpostavljenosti pesticidom, kajenju (kadarkoli ali nikoli) in rednem uživanju kave.

Preiskovance smo povabili k sodelovanju in jim razložili namen ter potek naše raziskave. Preiskovanci, ki so se strinjali z vključitvijo v raziskavo, so sami ali s pomočjo genetskega svetovalca, zdravnika nevrologa ali medicinske sestre, specializirane za parkinsonizem, izpolnili vprašalnik in podpisali pisno privolitev za sodelovanje v raziskavi. Pri preiskovancih smo nato odvzeli vzorec venske krvi za izolacijo genomske DNA.

3.3. ANALIZA ETIOLOŠKIH DEJAVNIKOV PRI IDIOPATSKI PARKINSONOVI BOLEZNI

3.3.1 Analiza družinske pojavnosti Parkinsonove bolezni

Za namen analize družinske obremenitve, oblikovanja napovednega modela tveganja in izbora bolnikov za sekvenciranje nove generacije smo bolnike nadalje razdelili v skupino z visokim, srednjim in populacijskim tveganjem.

- Visoko tveganje smo opredelili ob prisotnosti vsaj dveh sorodnikov s PB, kadar je eden od njiju v prvem kolenu sorodstva z bolnikom.

- Srednje tveganje smo opredelili ob prisotnosti samo enega sorodnika v prvem kolenu ali prisotnosti dveh sorodnikov, izmed katerih ni nobeden v prvem kolenu sorodstva z bolnikom.
- Populacijsko tveganje smo opredelili pri bolnikih s samo enim sorodnikom v drugem kolenu ali dlje in pri bolnikih brez družinske pojavnosti PB.

3.3.2 Analiza družinske pojavnosti bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah

Z metodo pisnega anketiranja smo zbrali podatke o družinski anamnezi za bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah. Preiskovanci so imeli možnost izbora kroničnih bolezni s seznama na vprašalniku (Alzheimerjeva bolezen/demenca, diabetes (tip 1 ali tip 2), depresija, melanom), poleg tega so imeli možnost dodajanja drugih bolezni, ki niso bile vključene v vprašalnik. Družinsko anamnezo smo ocenili kot pozitivno, kadar je bila ta bolezen prisotna pri vsaj enem sorodniku v prvem ali drugem kolenu sorodstva.

3.3.3 Vpliv okoljskih dejavnikov tveganja

Z vprašalnikom smo pridobili podatke o morebitni izpostavljenosti znamenitim dejavnikom tveganja za PB. Izpostavljenost pesticidom smo opredelili kot prisotno, kadar je bil preiskovanec v preteklosti dlje časa poklicno ali zasebno (življenje v ruralnem okolju, obdelovanje vrta ali njive, poklicna izpostavljenost) izpostavljen pesticidom. Kajenje smo opredelili kot prisotno pri vseh preiskovancih, ki so kadarkoli v preteklosti redno kadili cigarete ali tobak. Redno pitje kave smo opredelili pri vseh preiskovancih, ki so se opredelili, da vsak dan pijejo vsaj eno kavo na dan.

3.3.4 Prispevek družinske anamneze in okoljskih dejavnikov k napovednemu modelu bolezni

Z uporabo metode navzkrižne validacije (Kruppa in sod., 2012) smo oblikovali tri napovedne modele tveganja. V prvi model smo vključili okoljske dejavnike tveganja

za PB (izpostavljenost pesticidom, kajenje, redno pitje kave). V drugem smo parametrom iz prvega modela dodali družinsko anamnezo za PB. V tretjem smo parametrom iz drugega modela dodali družinsko anamnezo za Alzheimerjevo bolezen/demenco, depresijo in melanom. Napovedno vrednost vsakega modela smo ocenili s pomočjo področja pod krivuljo (AUC, angl. *area under the curve*), ki pove kako natančno test razlikuje med bolniki s PB in zdravimi kontrolnimi preiskovanci.

3.3.5 Analiza izbranih genomskeih variant

3.3.5.1 Izolacija DNA

Pri bolnikih in zdravih preiskovancih smo po odvzemu vzorca venske krvi iz levkocitov periferne krvi izolirali genomsko DNA po standardnem postopku.

3.3.5.2 Izbor genomskeih variant za raziskavo

V sklopu raziskave smo za asociacijsko analizo izbrali osem nizkopenetrantnih genomskeih variant, predhodno konsistentno značilno povezanih s PB (Preglednica 3) (Coppedè, 2012; Lill in sod., 2012; Singleton in sod., 2013).

Preglednica 3: Izbrane genomske variante, njihov biotip, frekvence manj pogostega alela (MAF), aleli, razmerja obetov in vrednosti p (povzeto po Lill in sod., 2012: 5)

Lokus	Polimorfizem	Biotip	MAF	Alela	OR	P-vrednost
RAB25	rs34372695	RAB25 [-914 bp]	0,02	C > T	0,66	$3,31 \times 10^{-14}$
SLC41A1	rs947211	Intergenski SLC41A1 [-5556 bp]	0,23	A > G	0,91	$8,00 \times 10^{-10}$
STK39	rs2390669	intronski	0,13	C > A	1,19	$1,37 \times 10^{-09}$
SNCA	rs356219	intronski	0,41	G > A	1,29	$6,06 \times 10^{-65}$
ITGA8	rs7077361	intronski	0,12	C > T	0,88	$1,51 \times 10^{-08}$
LRRK2	rs1491942	intronski	0,21	G > C	1,17	$6,44 \times 10^{-15}$
HIP1R	rs10847864	intronski	0,39	T > G	1,15	$4,37 \times 10^{-17}$
MAPT	rs1800547	5'UTR	0,20	A > G	0,78	$7,97 \times 10^{-52}$

MAF = frekvence manj pogostega alela v skupini bolnikov in kontrolnih preiskovancev skupaj

OR = razmerje obetov

3.3.5.3 Postopek analize genotipov z metodo KASPar (KBioscience Competitive Allele-Specific Polymerase chain reaction) (LGC Genomics)

- PCR smo izvajali v ploščicah, ki omogočajo sočasno analizo 96 reakcij, pri vseh vzorcih smo uporabljali reakcijsko mešanico KASP 2XRxn Mix KASP 5000 V4,0.
- Reakcijsko mešanico za reakcijo KASPAR smo pripravili iz standardnih sestavin: DNA (2,5 µL), predreakcijske mešanice (Master mix) (2,5 µL), mešanice začetnih oligonukleotidov (0,07 µL) in H₂O.
- Ploščico smo vstavili v PCR-aparaturo in aktivirali KASP-termalni ciklični program.
- Meritve smo opravljali na aparaturi ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).
- Analizo KASP-genotipov smo izvedli pri 25 °C.

3.3.6 Genetski testi, neposredno ponujeni potrošnikom, in Parkinsonova bolezen

S pomočjo iskalnikov na internetu smo poiskali vse ponudnike DTC-storitev v Sloveniji (iskanje s ključnimi besedami genetsko testiranje, testiranje DNA/DNA-test, spletni DNA-test, test sline DNA, komplet DNA) in večje ponudnike v svetu, npr. 23andMe (<https://www.23andme.com>). Vse najdene strani smo pregledali z namenom pridobitve podatkov o ponujenih genetskih storitvah. Iskanje smo opravili februarja 2014 in ponovili oktobra istega leta. Analizirali smo vrste ponujenih genetskih storitev, oglaševane prednosti takega testiranja in spremljajoče storitve ob testiranju. Posebej smo se osredotočili na izbor genomskeih variant, s katerim DTC-ponudniki napovedujejo tveganje za PB.

3.3.7 Statistična obdelava podatkov

3.3.7.1 Deskriptivna statistika

Deskriptivno statistiko smo izračunali s pomočjo programa SPSS za Windows, verzija 17.0 oz. 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences Inc, Chicago, Illinois, ZDA).

Z metodo χ^2 smo izračunali vrednosti razmerij obetov (OR, angl. *odds ratio*) in njihovih 95 % intervalov zaupanja (CI). Merilo za statistično značilno različnost je bila vrednost $p < 0,05$.

3.3.7.2 Napovedni model tveganja

Z metodo navzkrižne validacije smo oblikovali tri napovedne modele tveganja (Kruppa in sod., 2012). Napovedno natančnost vsakega modela smo ocenili s pomočjo površine pod krivuljo ROC (*receiver operating characteristics*) AUC. Točnost vsakega modela smo ocenili z metodo navzkrižne validacije. Posamezniki z manjkajočimi podatki ali vrednostmi so bili izključeni iz oblikovanja napovednega modela tveganja in navzkrižne validacije.

3.3.7.3 Statistična analiza genotipov

S programom 7000 Sequence Detection System (Applied biosystems) smo analizirali vsak posamezni gen z alelno diskriminacijo. Za statistično vrednotenje razlik v frekvencah različnih alelov in genotipov med študijsko in kontrolno skupino smo uporabili test χ^2 . Test χ^2 smo uporabili tudi v primeru ugotavljanja Hardy-Weinbergovega ravnovesja.

Značilnost povezave med bremenom nizkopenetrantnih genomskeih variant in pozitivno družinsko anamnezo pri bolnikih s PB smo preverili s testom SKAT (SNP-set (Sequence) Kernel Association Test, ki rezultate analize nizkopenetrantnih variant obteži glede na njihovo pogostost (MAF) (Ionita-Laza in sod., 2013).

3.4 EKSOMSKO SEKVENCIRANJE PRI DRUŽINSKIH OBLIKAH PARKINSONOVE BOLEZNI

Pri izbrani populaciji 20 bolnikov s PB smo uporabili metodo NGS z namenom analize prispevka visokopenetrantnih in srednjepenetrantnih genomskeih variant in identifikacije novih genov za monogensko obliko PB. Kriteriji za vključitev bolnika v analizo NGS so bili na podlagi analize družinske pojavnosti PB ugotovljeno visoko

tveganje (prisotnost treh in več bolnikov znotraj ene družine), pozitivna družinska anamneza v prvem kolenu ali zgodnji začetek bolezni.

Analize smo se lotili večstopenjsko. Sprva smo bioinformacijsko oblikovali panel za genetsko analizo PB in opravili analizo, osredotočeno na vse dosedaj znane gene, povezane s PB. V panel za analizo PB smo vključili naslednje gene: *SNCA*, *LRRK2*, *PARK2*, *PINK1*, *PARK7*, *ATP13A2*, *ATP6AP2*, *ATP1A3*, *COMT*, *DCTN1*, *EIF4GI*, *FTL*, *GBA*, *GCH1*, *GIGYF2*, *MAPT*, *HTRA2*, *PLA2G6*, *POLG*, *PRKRA*, *SLC6A3*, *TH*, *UCHL1* in *VPS35*, ki predstavljajo unijo genov, vključenih v sezname za analizo PB večjih strokovnih diagnostičnih centrov v tujini (Cegat, 2015; Centogene, 2013; Gendia, 2015).

Če s panelom za analizo PB nismo našli mutacij v dosedaj znanih genih za PB, smo analizirali še različice v genih, vključenih v panel za nevrodegenerativne bolezni, ki smo ga oblikovali s pomočjo algoritma za iskanje po HPO (Human Phenotype Ontology) (Köhler in sod., 2014). V nevrodegenerativni panel smo vključili vse gene, ki imajo katerokoli asociacijo z ontološkimi termini *bradykinesia*, *rigidity*, *postural instability*, *tremor* in *parkinsonism*. Usmerjene analize (panel za PB in panel za nevrodegenerativne bolezni) smo opravili s pomočjo panela podjetja Illumina (Trusight in Trusight one sequencing panel Illumina, ki omogočata usmerjeno analizo 2760 genov oz. 4813 genov). Tretji korak je predstavljalо sekvenciranje celotnega eksoma.

Eksomsko sekvenciranje smo izvedli z uporabo zajetja tarčnih eksonskih sekvenc s pomočjo Agilent SureSelect Human All Exon v5. Sekvenciranje smo izvedli na sekvenatorju Illumina Hiseq 2500 po 2x100 odčitanj na način ujemanja koncov. Surove sekvenčne podatke smo obdelali s prilagojenim programom za analizo eksomov, ki temelji na programu za analizo sekvenčnih podatkov GATK (Genome Analysis Toolkit) (McKenna in sod., 2010). Vzporejanje z referenčno sekvenco hg19 smo izvedli z uporabo Burrows-Wheelerjevega orodja (*Burrows-Wheeler Aligner*), podvojena zaporedja smo odstranili z uporabo orodja MarkDuplicates (<http://broadinstitute.github.io/picard/index.html>), sledili so rekalibracija kakovosti branja posameznih baz, določanje različic, rekalibracija kakovosti določanja različic in filtriranje različic z uporabo orodij GATK (DePristo in sod., 2011).

Variante smo shranili in anotirali v zbirki variant in sistemu anotacije, temelječem na vtools in programu ANNOVAR (San lucas in sod., 2012; Wang in sod., 2010). Za transkriptno pozicioniranje variant smo uporabili genske modele refseq, za anotacijo SNP-jev pa anotacije dbSNP v138. Ocena populacijske variabilnosti je temeljila na frekvencah posameznih variant v naši zbirki več kot 500 eksomov in v različnih populacijah po svetu: Exome Aggregation Consortium (ExAC, 2014), UK10K (UK10K, 2011) in GoNL (Boomsma in sod., 2014).

Za oceno patogenosti drugačnopomenskih (angl. *missense*) variant smo uporabili napovednike patogenosti dbNSFP v2 (Liu in sod., 2013). Za nadaljnjo anotacijo učinkov variant smo dodatno uporabili napovednike SNPeff (Cingolani in sod., 2012). Kot poglaviten vir informacij evolucijske ohranjenosti sekvenc smo uporabili točkovanje GERP++ RS (Davydov in sod., 2010). Kot vir znanih z boleznijo povezanih variant smo vključili ClinVar (Landrum in sod., 2014).

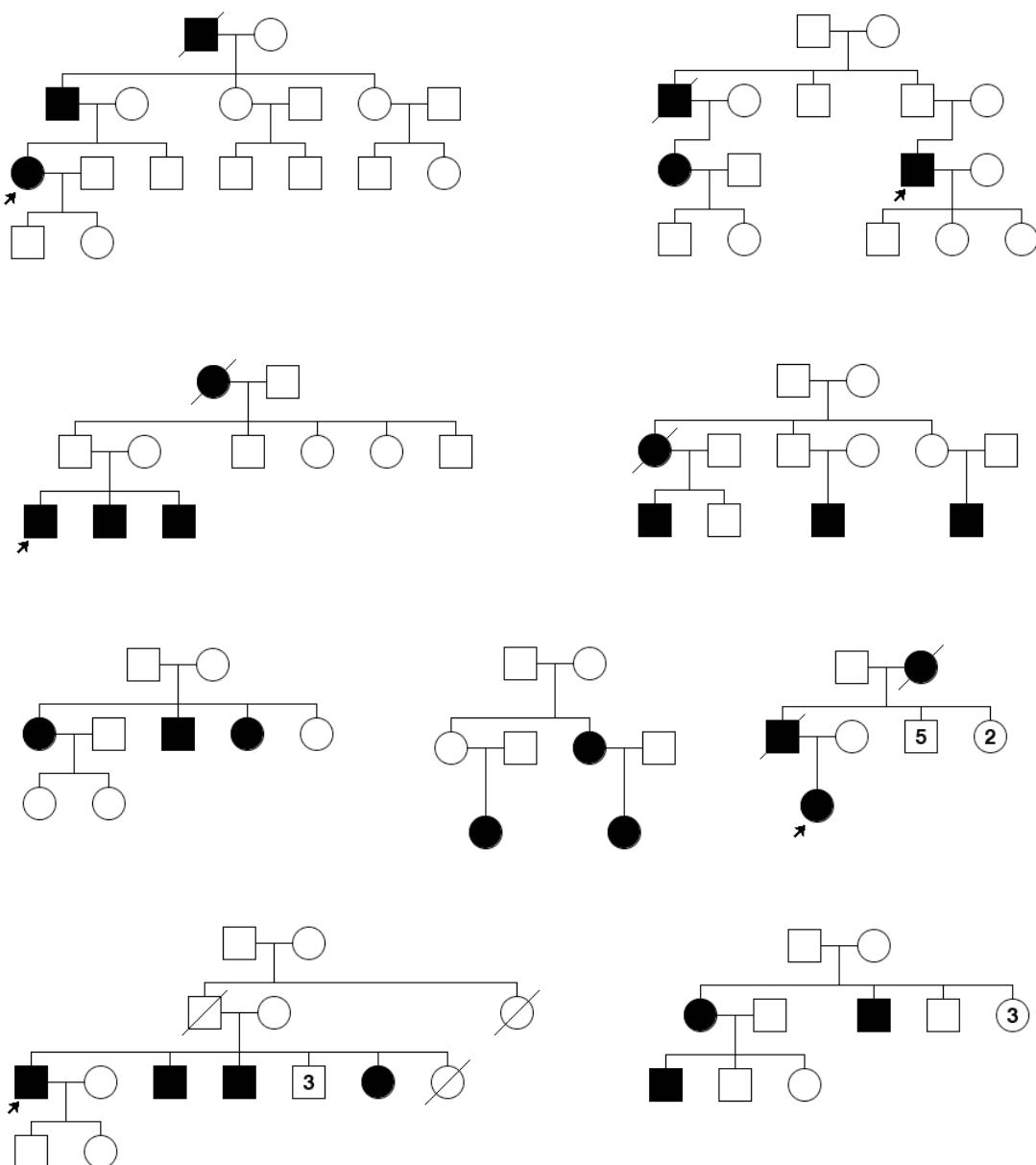
Dobljene variante smo filtrirali glede na de novo, avtosomno recesivne in X-vezane modele dedovanja. Upoštevajoč značne fenotipa, smo odstranili splošne variante s frekvenco nad 0,01 % za de novo model in variante nad 0,1 % za avtosomno recesivni in X-vezani model. Vse potencialno vzročne nove variante smo nato pregledali na poravnanim nivoju odčitavanja, da smo se izognili napačnim ocenam zaradi neporavnosti ali slabše pokritosti izvornih vzorcev. Vse sinonimne variante in intronske variante, oddaljene več kot 20 baznih parov od eksonov, smo izločili iz nadaljnje interpretacije.

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA ETIOLOŠKIH DEJAVNIKOV PRI IDIOPATSKI PARKINSONOVI BOLEZNI

4.1.1 Analiza družinske pojavnosti

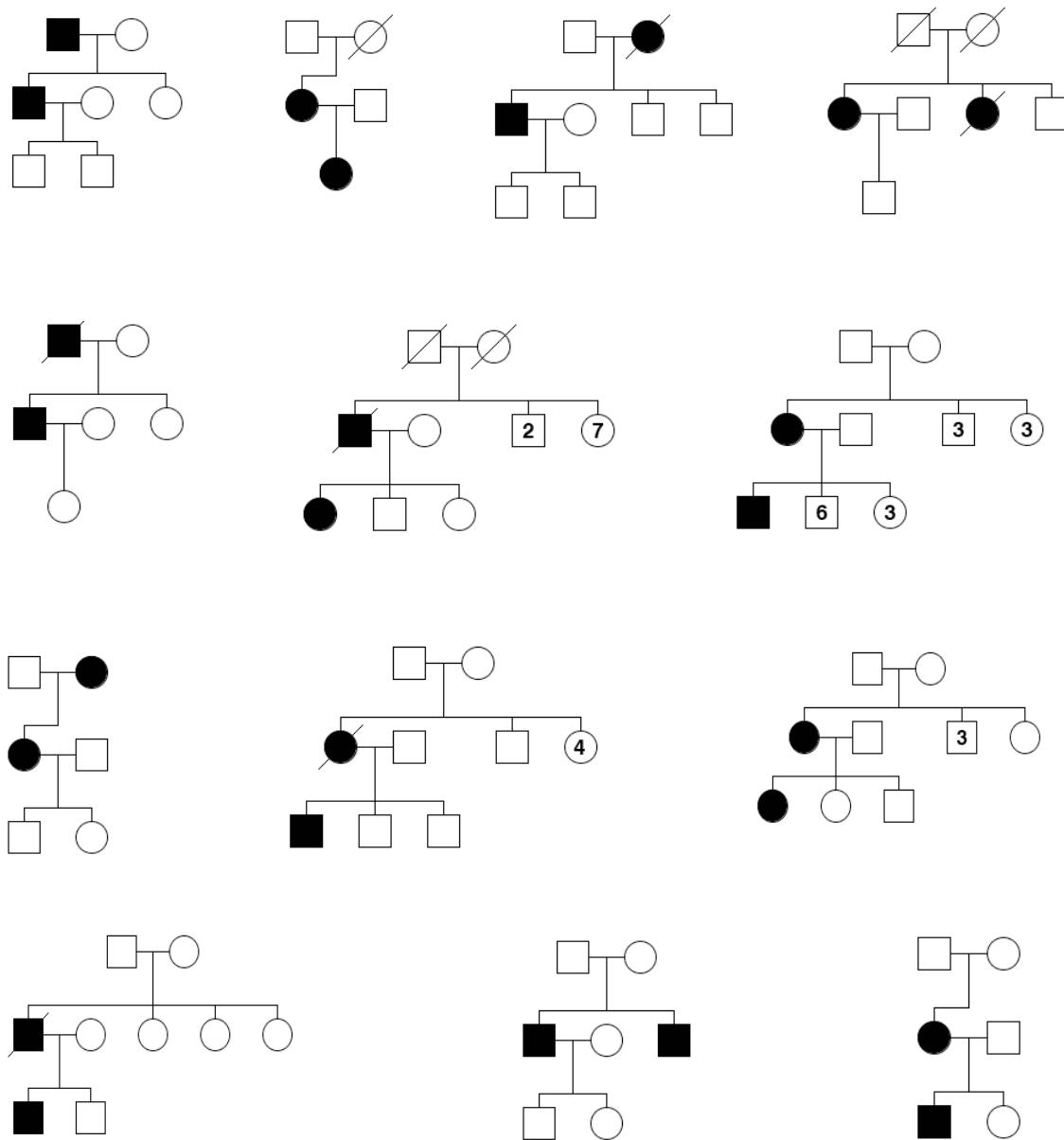
Visoko tveganje za PB na podlagi ocene družinske pojavnosti PB smo ugotovili pri 12 slovenskih bolnikih iz devetih družin. Rodovniki slovenskih družin z visokim tveganjem so prikazani na Sliki 4.



Slika 4: Rodovniki slovenskih družin z visokim tveganjem za Parkinsonovo bolezen

Figure 4: Family trees of Slovenian families with high risk of Parkinson's disease

Srednje tveganje za PB na podlagi ocene družinske pojavnosti PB smo ugotovili pri 13 bolnikih. Rodovniki slovenskih družin s srednje visokim tveganjem so prikazani na Sliki 5.



Slika 5: Rodovniki slovenskih družin s srednjim tveganjem za Parkinsonovo bolezen
Figure 5: Family trees of Slovenian families with medium risk of Parkinson's disease

Populacijsko tveganje na podlagi ocene družinske pojavnosti PB smo ugotovili pri 10 bolnikih s pozitivno družinsko anamnezo.

4.1.2 Vpliv okoljskih dejavnikov tveganja in družinske anamneze na tveganje za Parkinsonovo bolezen

V študijsko skupino smo vključili 192 bolnikov s potrjeno diagnozo PB in s povprečno starostjo $67,1 \pm 9,2$ leta. Med bolniki je bilo 115 (59,9 %) preiskovancev moškega spola. Povprečna starost ob začetku bolezni je bila $57,9 \pm 9,9$ leta. Najmlajši bolnik je zbolel pri starosti 30 let, najstarejši pa pri 84 letih.

Kontrolno skupino je sestavljalo 1659 zdravih preiskovancev s povprečno starostjo $40,8 \pm 10,2$ leta. V kontrolni skupini je bilo 1007 (60,7 %) preiskovancev moškega spola.

Pozitivno družinsko anamnezo za PB smo ugotovili pri 35 (18,2 %) bolnikih s PB (ob upoštevanju sorodnikov v prvem in drugem kolenu) (Preglednica 4). Zgodnji začetek bolezni je bil prisoten pri 35 (17,5 %) bolnikih, od tega jih je 7 (3,5 %) zbolelo pred 40. letom starosti.

Od znanih okoljskih dejavnikov tveganja za PB je bila izpostavljenost pesticidom povezana z večjim tveganjem za PB, kajenje in uživanje kave pa z manjšim tveganjem za PB (Preglednica 4).

V družinah bolnikov smo našli večjo prevalenco družinske sopojavnosti demenc, melanoma in depresije (Preglednica 4).

Preglednica 4: Primerjava izbranih spremenljivk med študijsko in kontrolno skupino

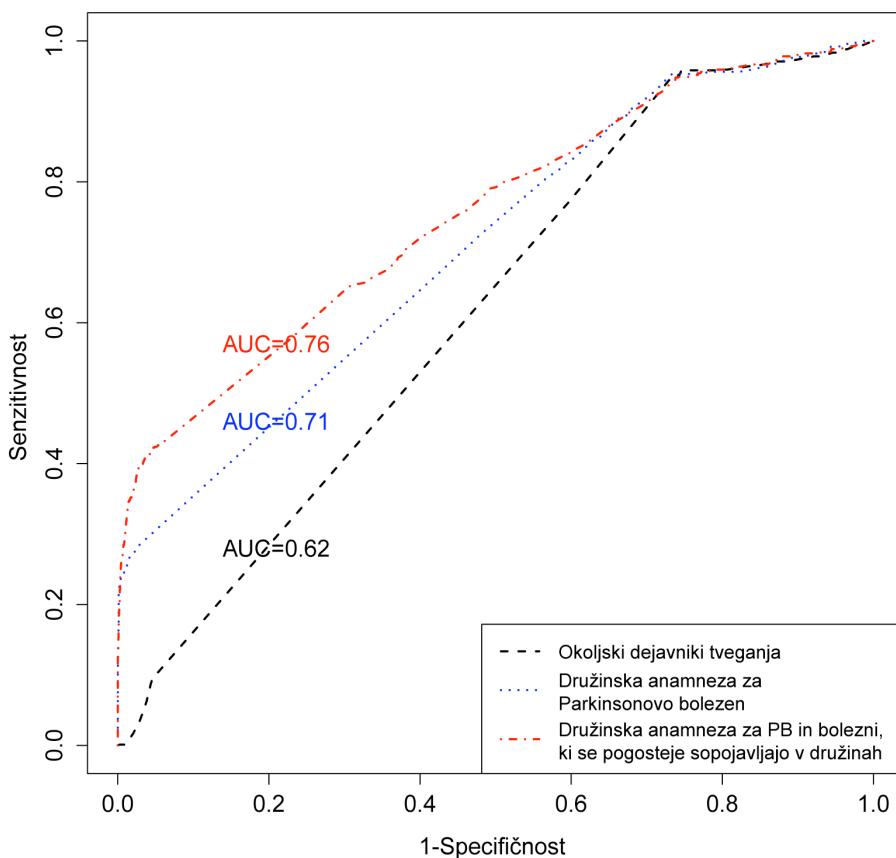
Table 4: Comparison of selected variables between the study group and control group

	Študijska skupina N=192 (%)	Kontrolna skupina N=1659 (%)	OR (95 % CI)	P-vrednost
Kajenje	10 (5,2)	444 (26,8)	0,15 (0,08–0,29)	< 0,0001
Kava	107 (55,7)	1141 (68,8)	0,57 (0,42–0,77)	0,0003
Izpostavljenost pesticidom	20 (10,4)	97 (5,8)	1,87 (1,13–3,11)	0,0152
Pozitivna DA za PB	35 (18,2)	20 (1,2)	18,27 (10,30–32,41)	< 0,0001
Pozitivna DA za demence	29 (15,1)	60 (3,6)	4,74 (2,96–7,60)	< 0,0001
Pozitivna DA za depresije	9 (4,7)	38 (2,4)	2,10 (1,00–4,41)	0,0505
Pozitivna DA za melanom	6 (3,1)	11 (0,6)	4,83 (1,77–13,22)	0,0021
Pozitivna DA za diabetes	50 (25,0)	348 (20,4)	1,30 (0,93–1,83)	0,1297
Pozitivna DA za multiplo sklerozo	10 (5,2)	29 (1,7)	3,1 (1,48–6,44)	0,0026

Legenda: DA = družinska anamneza, PB = Parkinsonova bolezen, 95 % CI = 95 % interval zaupanja.

4.1.3 Napovedni model tveganja

V prvi model smo vključili samo okoljske dejavnike tveganja in dosegli natančnost 0,62 (AUC) (95 % CI: 0,619–0,621). V drugem modelu smo v prvega vključili družinsko anamnezo za PB. Natančnost se je s tem statistično povečala na 0,71 (AUC) (95 % CI: 0,709–0,711). V tretjem modelu smo drugemu dodali družinsko anamnezo za demence, melanom in depresijo in s tem dosegli natančnost 0,76 (95 % CI: 0,757–0,763). Pozitivna napovedna vrednost tretjega modela je znašala 94,1 %, specifičnost 99,5 % in senzitivnost 74,5 %. AUC-krivulje za vse tri napovedne modele so prikazane na Sliki 6.



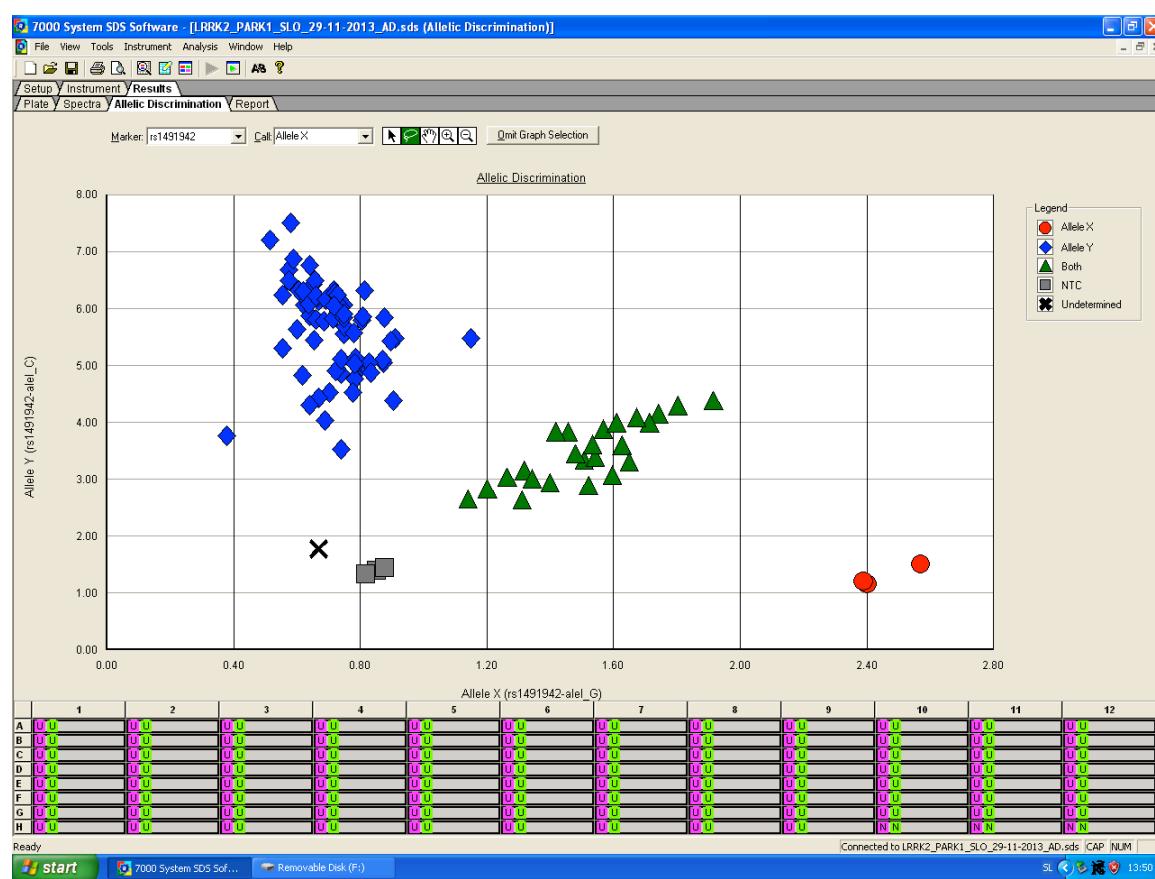
Slika 6: Primerjava AUC-krivulj za model 1 (okoljski dejavniki tveganja), model 2 (modelu 1 dodana družinska anamneza za Parkinsonovo bolezen) in model 3 (modelu 2 dodana družinska anamneza za bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah)

Figure 6: Receiver operating curves comparing risk model 1 (environmental risk factors) with model 2 (family history of Parkinson's disease added to model 1) and model 3 (family history of Parkinson's disease associated disorders added to model 2)

4.1.4 Analiza izbranih genomskeih variant

V študijsko skupino smo vključili 185 bolnikov s potrjeno diagnozo PB in s povprečno starostjo $67,5 \pm 9,4$. Med bolniki je bilo 116 preiskovancev moškega spola (62,7 %). Povprečna starost ob postavitvi diagnoze je bila $57,7 \pm 10,0$. Kontrolno skupino je sestavljalo 186 zdravih preiskovancev brez pozitivne družinske anamneze za PB s povprečno starostjo $52,0 \pm 5,3$. Med zdravimi preiskovanci je bilo 93 preiskovancev moškega spola (50,0 %).

Primer rezultata genotipizacije polimorfizma v genu LRRK2 je prikazan na Sliki 7.



Slika 7: Identifikacija genotipov LRRK2 rs1491942 po reakciji PCR v realnem času

Figure 7: Identification of LRRK2 rs1491942 genotypes after real-time PCR

Rezultati genotipizacije in alelne distribucije genomskeih variant v genih *SNCA*, *LRRK2*, *MAPT*, *STK39*, *RAB25*, *ITGA8*, *SLC41A1* in *HIP1R* v skupini bolnikov in v skupini kontrolnih preiskovancev so prikazani v Preglednicah 5 in 6. Frekvence genotipov so se pri vseh preučevanih polimorfizmih porazdelile v skladu s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem ($p>0,05$).

Preglednica 5: Vpliv posameznih nizkopenetrantnih genomskeih variant na tveganje za Parkinsonovo bolezen: analiza genotipov

Table 5: Analysis of selected polymorphisms on Parkinson's disease risk: genotype analysys

Genotip		Kontrolni preiskovanci (%)	Bolniki (%)	χ^2	P	P kor.	OR [95 % interval zaupanja]
<i>SNCA</i> rs356219	AA	69 (37,1)	53 (28,6)	3,27	0,071	0,57	GG+GA/AA 1,49 [0,96–2,32]
	AG	83 (44,6)	86 (46,5)				
	GG	32 (17,2)	46 (24,9)				
<i>LRRK2</i> rs1491942	GG	123 (66,1)	119 (64,3)	3,25	0,072	0,58	GG+CG/CC 2,36 [0,91–6,92]
	CG	49 (26,3)	58 (31,4)				
	CC	14 (7,5)	6 (3,2)				
<i>MAPT</i> rs1800547	AA	121 (65,1)	138 (74,6)	6,45	0,011	0,09	GG/AA+AG 0,12 [0,01–0,67]
	AG	56 (30,1)	44 (23,9)				
	GG	9 (4,8)	1 (0,5)				
<i>STK39</i> rs2390669	AA	143 (76,9)	142 (76,8)	0,2	0,653	5,22	AA+AC/CC 1,47 [0,22–12,8]
	AC	39 (21,0)	41 (22,2)				
	CC	3 (1,6)	2 (1,1)				
<i>RAB25</i> rs34372695	CC	178 (95,7)	174 (94,1)	0,52	0,472	3,78	CT+TT/CC 1,4 [0,55–3,74]
	CT	8 (4,3)	11 (5,9)				
	TT	0	0				
<i>ITGA8</i> rs7077361	TT	145 (78,0)	152 (82,2)	5,04	0,025	0,20	*
	TC	36 (19,4)	33 (17,8)				
	CC	5 (2,7)	0				
<i>SLC41A1</i> rs947211	GG	107 (57,5)	127 (68,6)	5,26	0,022	0,18	GA+AA/GG 0,61 [0,4–0,93]
	GA	66 (35,5)	49 (26,5)				
	AA	13 (7,0)	8 (4,3)				
<i>HIP1R</i> rs10847864	GG	79 (42,5)	76 (41,1)	0,08	0,771	6,17	GT+TT/GG 1,1 [0,57–2,11]
	GT	85 (45,7)	88 (47,6)				
	TT	22 (11,8)	20 (10,8)				

* izračun razmerja obetov ni mogoč zaradi odsotnosti homozigotov CC v skupini bolnikov

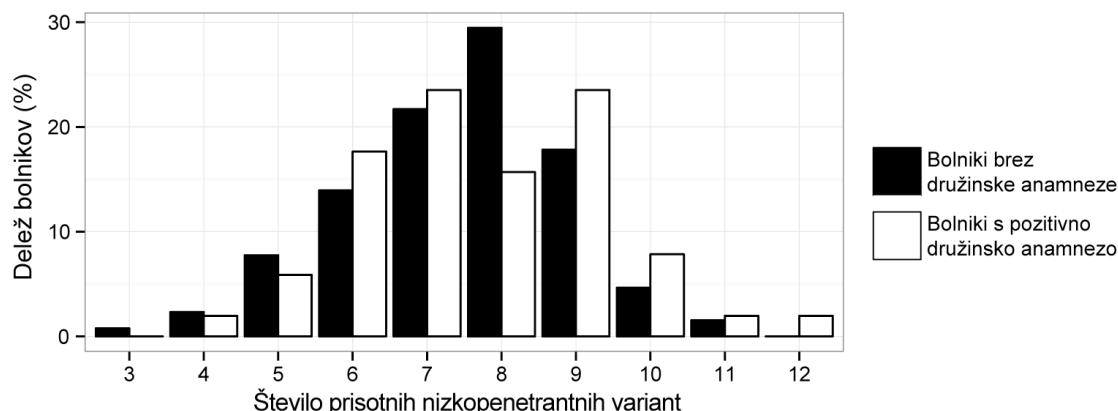
P kor.: korigirane p-vrednosti po Bonferronijevi metodi zaradi večkratnega testiranja

Preglednica 6: Vpliv posameznih nizkopenetrantnih genomskeih variant na tveganje za Parkinsonovo bolezzen: analiza alelov

Table 6: Analysis of selected polymorphisms on Parkinson's disease risk: allele analysis

Alel		MAF	MAF Kontrolna skupina	MAF Bolniki	χ^2	P	P kor.	OR [95 % interval zaupanja]
<i>SNCA</i> rs356219	G > A	0,44	0,40	0,48	4,99	0,026	0,21	1,39 [1,04–1,87]
<i>LRRK2</i> rs1491942	G > C	0,19	0,21	0,19	0,29	0,593	4,74	0,91 [0,63–1,30]
<i>MAPT</i> rs1800547	G > A	0,16	0,20	0,13	7,27	0,007	0,06	0,58 [0,39–0,86]
<i>STK39</i> rs2390669	C > A	0,12	0,12	0,12	0	1	8	1,00 [0,64–1,55]
<i>RAB25</i> rs34372695	T > C	0,02	0,02	0,03	0,5	0,478	3,82	1,39 [0,55–3,51]
<i>ITGA8</i> rs7077361	C > T	0,10	0,12	0,09	2,32	0,128	1,02	0,69 [0,43–1,11]
<i>SLC41A1</i> rs947211	A > G	0,21	0,25	0,18	5,53	0,019	0,15	0,65 [0,46–0,93]
<i>HIP1R</i> rs10847864	T > G	0,35	0,35	0,35	0	0,976	7,81	1,01 [0,74–1,36]

Primerjali smo porazdelitev seštevka učinkov vseh analiziranih nizkopenetrantnih genomskeih variant pri bolnikih s pozitivno družinsko anamnezo in pri sporadičnih bolnikih (Slika 8). Razlika v porazdelitvi ni bila statistično značilna ($p = 0,22$).



Slika 8: Porazdelitev seštevka števila nizkopenetrantnih genomskeih variant pri bolnikih z družinsko obliko Parkinsonove bolezni v primerjavi s sporadičnimi bolniki

Figure 8: Distribution of cumulative number of low penetrant genomic variants between familial and sporadic patients with Parkinson's disease

4.1.5 Pomen nizkopenetrantnih genomskeih variant za identifikacijo oseb s povečanim tveganjem za razvoj bolezni

V Sloveniji DTC-genetske teste nudi pet zasebnih ponudnikov in trije zavodi za zdravstveno zavarovanje (Zavarovalnica Triglav, Zavarovalnica Maribor in Adriatic). DTC-testiranje se izvaja brez ustreznegata genetskega svetovanja. Uporabniku so na voljo testi s potencialnim medicinskim pomenom (testiranje mutacij v genu za raka dojke), napovedni testi za kompleksne bolezni (PB, Alzheimerjeva bolezen, MS, hipertenzija, diabetes in številne druge), farmakogenetski testi odziva na zdravila in testi, nepovezani z zdravjem (nutrigenetika, očetovstvo, predniki). Zavarovalnice svojim zavarovancem genetske DTC-teste ponujajo kot dodano vrednost ob sklenitvi zavarovalne police. Vsi ponudniki obljudljajo zaupnost genetskih podatkov, ki naj ne bi bili dostopni v druge namene. Zavarovalnice teste ponujajo v sodelovanju s privatnimi ponudniki DTC-testov.

V Sloveniji genetski test za PB ponujata Inštitut za DNK analize (<http://www.dnk4you.com>) in Zavarovalnica Triglav (<http://www.triglav.si/dnk>). V

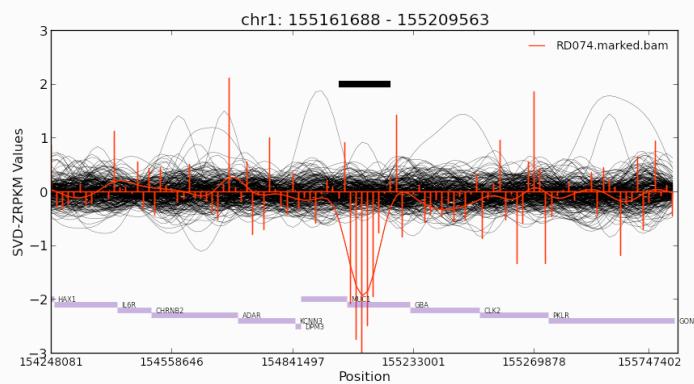
analizo so vključene nizkopenetrantne genomske variante v genih *SNCA* (rs356219), *LRRK2* (rs34637584), *PARK16* (rs823128), *MAPT* (rs199533) in *BST1* (rs11724635) kot napovedni dejavniki tveganja za PB ter številne druge variante, vpletene v napoved tveganja za druge bolezni (Alzheimerjeva bolezen, atrijska fibrilacija, kronična ledvična bolezen).

4.1.6 Eksomsko sekvenciranje

V populaciji 20 bolnikov z družinsko obliko PB smo z uporabo NGS pri šestih bolnikih našli spremembe v genu *GBA*. Od tega smo našli pet heterozigotnih drugačnopomenskih (angl. *missense*) mutacij – dva bolnika z mutacijo E365K, dva z mutacijo N409S in bolnik s spremembo E427K (Preglednica 7) – in delecijo prvih petih eksonov gena *GBA* (Slika 8). Prvi dve mutaciji sta pogosti, že znani mutaciji v genu *GBA*, mutacija E388K je bila opisana leta 2014 pri 5 bolnikih s PB v italijanski kohorti bolnikov (Asselta in sod., 2014).

Preglednica 7: Spremembe v genu *GBA* v populaciji bolnikov z družinsko obliko Parkinsonove bolezni
Table 7: *GBA* gene mutations in our cohort of patients with familial Parkinson's disease

dbSNP	tip	mutacija	SIFT	POLYPHEN
rs2230288	eksonska	E365K (E326K)	TOLERATED	benign
rs76763715	eksonska; splicing	N409S (N370S)	DAMAGING	possibly damaging
rs149171124	eksonska	E427K (E388K)	TOLERATED	benign



Slika 9: Delecija prvih petih eksonov v genu *GBA* pri bolniku z družinsko obliko Parkinsonove bolezni
Figure 9: Deletion of first five exons in *GBA* gene in a patient with familial Parkinson's disease

Dodatno smo ugotovili heterozigotno drugačnopomensko mutacijo c.844A>T (p.Ser282Cys) v genu *ATP13A2* pri bolnici z zgodnjim začetkom bolezni in drugačnopomensko mutacijo c.1370A>C (p.Asn451Thr) v genu *GIGYF2* pri bolniku s pridruženo demenco. V obeh primerih je razširjena družinska analiza pokazala, da najdeni genetski spremembi ne segregirata s klinično sliko.

5 RAZPRAVA

Učinkovitega pristopa k identifikaciji posameznikov s povečanim tveganjem za razvoj Parkinsonove bolezni (PB) na nivoju javnega zdravja ni. V raziskavi smo poskušali z globalnim genomskim pristopom na več nivojih (družinska anamneza, genomska variabilnost visoko-, srednje- in nizkopenetrantnih variant) prispevati k napovedi tveganja oziroma razumevanju etiologije PB. Pokazali smo, da družinska anamneza tako za PB kot za bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, poleg znanih okoljskih dejavnikov tveganja pomembno prispeva k napovedi tveganja za PB. Ugotovili smo pomemben vpliv mutacij v genu *GBA*, medtem ko drugih mutacij v dosedaj poznanih ali pa eventualno novih genih, pri družinskih bolnikih s PB nismo ugotovili. Nizkopenetrantne genomske variante niso predstavljale pomembnega dejavnika tveganja niti posamično niti v seštevku in z njimi nismo pojasnili družinske pojavnosti PB.

5.1 DRUŽINSKA POJAVNOST PARKINSONOVE BOLEZNI

Ugotovili smo, da je v slovenski populaciji družinska pojavnost PB značilno pogostejša v skupini bolnikov. Pozitivno družinsko anamnezo smo ugotovili pri 35 bolnikih (18,2 %) v primerjavi z 1,2 % kontrolnih preiskovancev ($OR = 18,2, p < 0,001$). Pri 12 bolnikih (6,3 %) smo odkrili visoko tveganje na podlagi družinske pojavnosti PB, pri 13 (6,8 %) pa srednje. V večini objavljenih študij se povečano tveganje za sorodnike giblje med 2,6 in 8,1 (OR) (Gorell in sod., 2004; Rybicki in sod., 1999; Taylor in sod., 1999). Leta 2008 objavljena metaanaliza je ob vključitvi le študij z najbolj strogimi kriteriji ugotovila relativno tveganje za sorodnike v prvem kolenu 2,9 (RR) (Thacker in Ascherio, 2008). V naši raziskavi smo ugotovili večjo družinsko pojavnost PB kot večina objavljenih študij, kar lahko odseva večje zanimanje bolnikov z družinsko pojavnostjo, da se vključijo v raziskavo, in hkrati zdravnikov, da te bolnike usmerijo v genomske raziskave. Po drugi strani Coppedè (2012) poroča, da je družinska pojavnost PB prisotna pri približno 20 % vseh bolnikov, kar je podobno našim ugotovitvam.

5.2 DRUŽINSKA POJAVNOST BOLEZNI, KI SE POGOSTEJE SOPOJAVLJAJO V DRUŽINAH

Pokazali smo, da je v slovenskih družinah bolnikov značilno večja pojavnost bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah: demence ($p < 0,0001$), melanoma ($p = 0,002$) in depresije ($p = 0,05$).

Družinska pojavnost melanoma v prvem kolenu sorodstva je bila predhodno povezana s povečanim tveganjem za PB (Gao in sod., 2009). Kot najverjetnejši skupni etiološki modul bolezni je bila predlagana pot presnove tirozina, poleg tega je bila ugotovljena zanimiva asociacija med genomske variantami *PLA2G6* in tveganjem za melanom (Paisán-Ruiz in Houlden, 2010).

Večja sopojavnost Alzheimerjeve bolezni in PB je bila dokazana v družinah s pozitivno družinsko anamnezo za obe nevrodegenerativni bolezni (Rosen in sod., 2007), pri sorojencih bolnikov s PB s pridruženo demenco pa je bilo ugotovljeno večje tveganje za Alzheimerjevo bolezen (Marder in sod., 1999). Predpostavljen je bil obstoj skupne nevrodegenerativne patogeneze (Marder in sod., 1999; Rosen in sod., 2007). Sistematična raziskava preseka kliničnih in etioloških dejavnikov Alzheimerjeve bolezni in PB je na več nivojih pokazala skupne elemente. Skupni so nekateri simptomi obeh bolezni (depresija, vizualne halucinacije, anosmija), patogenetske poti (prizadetost istih bioloških modulov) – oksidativni stres, abnormalnosti glutamatnih receptorjev, vnetje, disfunkcija ubikvitin-proteasomskega sistema, aktivacija citokinskega odziva, disfunkcija nevrotrofnih faktorjev, poškodbe mitohondrijev, abnormalnosti citoskeleta, sinaptična disfunkcija in aktivacija apoptotskih poti – ter tvegane genomske variante (*APOE*, *MAPT*, *CYP2D6*, *A2M*, *NOS1*, *BDNF*) in ekspresija genov (12 genov se je diferencialno izrazilo na isti način in v istem delu centralnega živčnega sistema) (Grunblatt, 2008). Variante mitohondrijske DNA predstavljajo dejavnik tveganja za obe bolezni, poleg tega so pri obeh našli povečano število somatskih DNA-mutacij (Bender in sod., 2006; Coskun in sod., 2012; Yan in sod., 2013). Disfunkcija endoplazmatskega retikuluma je vpletena v patogenezo obeh bolezni (Roussel in sod., 2013). Sopojavnost AB in PB pri istem bolniku se pojavlja značilno pogosteje, kot bi to pričakovali glede na prevalenco obeh bolezni (Grunblatt, 2008).

Družinsko sopojavnost depresije in PB je preučeval Fahim in sod. (1998), vendar se povezava ni pokazala kot značilna, kljub temu da se depresija pojavlja pri skoraj 40 % bolnikov s PB (Cummings, 1992). Študija incidence depresije v preteklosti je pokazala večjo stopnjo le-te pri posameznikih, ki so pozneje razvili PB, kar kaže na možnost skupnih patofizioloških poti opisanih bolezni (Leentjens in sod., 2003). Medtem ko je na nivoju komorbidnosti precej dokazov za preplet PB in depresije, je le malo raziskav preučevalo preplet obeh bolezni kot neodvisnih entitet.

Sopojavnosti diabetesa in PB v slovenskih družinah nismo ugotovili. Rezultati so skladni s predkratkim objavljenou metaanalizo (Cereda in sod., 2011), ki ni potrdila povezave med boleznima kljub večim raziskavam, ki so pri bolnikih z diabetesom pokazale povečano tveganje za PB (Hu in sod., 2007; Skeie in sod., 2013; Klimek in sod., 2015).

Ob analizi družinske anamneze smo ugotovili, da so bolniki s PB pogosteje poročali o pojavnosti MS v družini. Medtem ko so v literaturi zabeleženi sporadični opisi bolnikov z obema boleznima (Barun in sod., 2008; Sadnicka in sod., 2013; Valkovic in sod., 2007), pogostejša sopojavnost v družinah še ni bila opisana. Kljub temu da sta PB in MS tradicionalno pojmovani kot dve različni kategoriji bolezni (MS kot nevroinflamatorna in PB kot nevrodgenerativna bolezen), pa poglobljena analiza in najnovejša spoznanja kažejo, da si nevroinflamatorne in nevrodgenerativne poti delita (Hauser in Oksenberg, 2006; Przedborski, 2010; Stadelmann, 2011; Trapp in Nave, 2008; Wüllner in Klockgether, 2003). V skupne patološke poti so vpleteni disfunkcija mitohondrijev, oksidativni stres in vnetni dejavniki (Sadnicka in sod., 2013). Genetska variabilnost v genih *APOE* in *HLA-DRB5* je bila povezana tako z MS kot z idiopatsko PB (Huang in sod., 2004; Sadnicka in sod., 2013). *HLA*-geni so bili povezani s PB v dveh GWAS-študijah (Hamza in sod., 2010), asociacija je bila ponovljena v poznejši metaanalizi, kar dodatno potrjuje hipotezo o vlogi imunske komponente v patofiziologiji PB (Ahmed in sod., 2012). Imunohistokemične študije plakov pri MS so pokazale povečane količine produktov genov za PB *PARK2* in *PINK1* pri akutni MS (Wilhelms in sod., 2011; Witte in sod., 2009). Okužbe kot vzrok MS je preiskovalo veliko raziskav, ki so ugotovile povečano tveganje za MS po infekcijski mononukleozi in pozni okužbi z drugimi pogostimi virusi (mumps, ošpice) (Hernán in sod., 2001). Zadnje raziskave kažejo na možno vlogo okužb tudi v

etiologiji PB. Ugotovili so značilne povezave med prebolelimi okužbami in PB za mumps, škrlatinko, gripo, oslovski kašelj in herpes (Vlajinac in sod., 2013). Vedno več podatkov kaže na pomen bakterijskih in virusnih okužb kot možnih dejavnikov tveganja za nevrodegenerativne bolezni (Chiara in sod., 2012).

Z analizo družinske anamneze za bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, smo pokazali, da se določene bolezni v družinah sopojavljajo bolj pogosto in da lahko to potencialno uporabimo kot napovedno vrednost pri oblikovanju programov javnega zdravja za identifikacijo posameznikov s povečanim tveganjem, ter podprli hipotezo o modularnih povezavah med posameznimi boleznimi (modularna zgradba bolezni).

Družinsko pojavnost bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, lahko pojasnimo z vpletenostjo istih bioloških poti v patogenezo teh bolezni. Biološki procesi potekajo usklajeno v organiziranih bioloških mrežah in poteh. Globalno razumevanje kompleksnih bioloških sistemov omogočajo raziskave na sistemski ravni, s čimer se ukvarja sistemska biologija (angl. *systems biology*) (Ideker in sod., 2001). Sistemska biologija preučuje in integrira poznavanje mrež genskih in proteinskih interakcij, bioloških poti ter mehanizmov uravnavanja bioloških procesov. Sistemski pristop zahteva raziskave iz različnih vidikov in integracijo genomskeh podatkov na različnih ravneh (genomika, transkriptomika, epigenomika, proteomika, metabolomika). Za molekularno opredelitev sopojavnosti bolezni bi bil na primer primeren pristop s študijo proteinskih interakcij.

5.3 OKOLJSKI DEJAVNIKI TVEGANJA

Poleg bolezni, za katere smo ugotovili pogostejšo pojavnost v družinah bolnikov s PB, smo analizirali tudi okoljske dejavnike tveganja. Ugotovili smo zaščitni učinek uživanja kave in kajenja, medtem ko je bila izpostavljenost pesticidom povezana s povečanim tveganjem za PB, kar je v skladu z rezultati tujih raziskav. Izpostavljenost pesticidom in herbicidom ter uživanje studenčnice sta povezana s povečanim (Dick in sod., 2007; Taylor in sod., 1999), uživanje kave in kajenje pa z zmanjšanim tveganjem za PB (Kieburtz in Wunderle, 2013).

5.4 NAPOVED TVEGANJA IN PRESEJALNI PROGRAMI V JAVNEM ZDRAVJU

Za oceno napovednega modela tveganja smo združili vse opisane napovedne dejavnike, ki so se v naši raziskavi pokazali kot pomembni (družinska pojavnost PB in bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, okoljski dejavniki). Pokazali smo, da ob upoštevanju znanih okoljskih dejavnikov napovedno vrednost povečamo, če vključimo še družinsko pojavnost PB, in še dodatno, če vključimo družinsko pojavnost bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah (Vrečar in sod., 2015a). Naša spoznanja so lahko pomembna za oblikovanje bodočih javnozdravstvenih programov za identifikacijo oseb s povečanim genetskim tveganjem za pojav PB.

V osnovni model tveganja smo vključili okoljske dejavnike tveganja ($AUC = 0,62$), v drugem smo dodali družinsko anamnezo za PB ($AUC = 0,71$). Podobne rezultate na osnovi kombinacije družinske anamneze in okoljskih dejavnikov tveganja je pokazala raziskava, ki so jo objavili Hall in sod. (2013). Z vključitvijo bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, smo napovedno vrednost modela še dodatno izboljšali ($AUC = 0,76$).

5.5 POMEN NIZKOPENETRANTNIH GENOMSKIH VARIANT ZA IDENTIFIKACIJO OSEB S POVEČANIM TVEGANJEM ZA RAZVOJ BOLEZNI

Pristopa k celostnemu razumevanju idiopatske PB smo se lotili na eni strani z analizo družinske anamneze, ki odraža skupne genetske dejavnike in skupno življenjsko okolje družine, in na drugi strani z analizo prispevka nizkopenetrantnih genomskeih variant. Trenutno najverjetnejša hipoteza je, da nizkopenetrantne genomske variante predstavljajo pomemben del prispevka, ki ga vidimo skozi družinsko anamnezo (Hall in sod., 2013). Iz tega sledi naša hipoteza, da je družinsko pojavljanje PB posledica aditivnega učinka posameznih variant, ki se kopijo v družinah (družinsko genetsko breme). Analiza aditivnega učinka posameznih variant je pri bolnikih z družinsko obliko MS pokazala večje kopiranje znanih pogostih genomskeih variant v primerjavi s sporadičnimi bolniki (Gourraud in sod., 2011). Pri PB raziskave aditivnega učinka posameznih nizkopenetrantnih genomskeih variant za družinsko obliko bolezni še ni bilo.

Osnovna asociacijska analiza ni pokazala statistično značilnih razlik v pojavnosti genomskeih variant med skupino bolnikov in zdravih preiskovancev, kljub temu da smo analizirali znane genomske variante, potrjene v predhodnih študijah GWAS in metaanalizah (Lill in sod., 2012; Nalls in sod., 2011). Učinki posameznih analiziranih variant so lahko premajhni za zaznavo v manjših asociacijskih študijah.

Z nadgradnjo asociacijske analize z upoštevanjem aditivnega učinka posameznih nizkopenetrantnih variant hipoteze, da je družinsko pojavljanje PB posledica aditivnega učinka posameznih variant, ki se kopijo v družinah, nismo potrdili. Predpostavljam, da je za razlogo družinske pojavnosti PB treba identificirati druge (genetske) vzroke, morda med srednjepenetrantnimi genetskimi variantami, kot so spremembe v genu *GBA*.

Kljub nizki napovedni vrednosti nizkopenetrantnih genomskeih variant kot izoliranih dejavnikov tveganja so širši populaciji na voljo DTC-testi, ki temeljijo na analizah teh variant. V sklopu storitev DTC-testov v Sloveniji je na voljo napoved tveganja, da bo posameznik zbolel za PB. Napoved tveganja temelji na analizi petih nizkopenetrantnih genomskeih variant. Mednarodne smernice in slovenska stroka so kritične do uporabe DTC-genetskih storitev v zdravstvene namene (Vrečar in sod., 2015b; European Society of Human Genetics, 2010).

5.6 POMEN SREDNJEPENTRANTNIH IN VISOKOPENETRANTNIH GENOMSKIH VARIANT

V slovenski populaciji bolnikov z družinsko obliko bolezni smo pri 6 (30 %) odkrili mutacije v genu *GBA*. V primerjavi s podatki iz literature, po katerih naj bi bile *GBA*-mutacije prisotne pri približno 5–10 % bolnikov s PB (Beavan in Schapira, 2013) smo ugotovili večji delež bolnikov, kar gre morda pripisati izboru bolnikov s pozitivno družinsko anamnezo, ki je značilno bolj pogosta pri nosilcih mutacije *GBA* (Sidransky in sod., 2009). Mutacije v genu *GBA* so povezane s pomembno visokim tveganjem za nastop PB (Anheim in sod., 2012; Sidransky in sod., 2009) in predstavljajo poseben izziv za genetsko svetovanje.

Raziskava penetrance mutacij v genu *GBA* je pokazala, da do starosti 80 let za PB zbole kar do 30–40 % heterozigotnih nosilcev mutacij gena *GBA*. Opisana ugotovitev kaže na možnost, da gre pri *GBA* dejansko za dominantno mutacijo z znižano penetranco (Anheim in sod., 2012). Razlike med opisano penetranco pri *GBA* in na primer znanimi penetrancami drugih dominantnih genov pri PB (duplicacija *SNCA* s 40 % doživljenjsko penetranco, *LRRK2* p.G2019S s 74 % penetranco v starosti 97 let) so relativno majhne in kot take odpirajo možnosti različnih interpretacij pomena ugotovljenih mutacij. Meja prehoda med srednje- in visokopenetrantnimi genomske variantami ni jasno začrtana in pomen prvih še ni dobro opredeljen. Naši rezultati kažejo na pomemben doprinos srednjepenetrantnih variant (gena *GBA*) k etiologiji jasno družinskih primerov bolezni.

Prvotne družinske raziskave so pokazale, da so mutacije v genu *LRRK2* povezane z dominantno, mutacije v genih *PARK2* in *PINK-1* pa z recesivno obliko PB. Poznejše genetske analize bolnikov so pokazale, da genetika PB ni tako enostavna: do 70 % nosilcev mutacij v genu *LRRK2* ni imelo PB, poleg tega je več kot 50 % bolnikov z mutacijami v genih *PARK2* in *PINK-1* imelo identificirano samo eno heterozigotno mutacijo (Klein in sod., 2007). Kljub temu da je najpogostejša mutacija v genu *LRRK2* povezana z od starosti odvisno penetranco, so mutacijo ugotovili pri dveh zdravih 80-letnikih (Belin in sod., 2006). Heterozigotne mutacije glede na relativno pogostost pojavnosti v splošni populaciji verjetno predstavlajo (močan) dejavnik tveganja za (pomemben) delež bolnikov s PB, pri katerih preplet genetskih, epigenetskih in okoljskih dejavnikov vodi v razvoj bolezni (Klein in sod., 2007)

Najdena sprememba v genu *ATP13A2*, ki ni skladna z družinsko segregacijo bolezni, ne podpira opisanega pomena heterozigotne mutacije v tem genu. Gen *ATP13A2* je sicer v homozigotni obliki povezan s Kufor-Rakebovim sindromom (Parkinsonova bolezen tipa 9), za katerega je značilen hitro napredajoč parkinsonizem z zgodnjim začetkom in dodatnimi znaki, ki vključujejo piramidno simptomatiko, kognitivni upad in izgubo odzivnosti na zdravljenje z levodopo (Lai in sod., 2012). Identična mutacija v genu *ATP13A2* je bila opisana v študiji 112 bolnikov s PB, med katerimi so ugotovili 4 nosilce mutacij v tem genu (Djarmati in sod., 2009). Vloga heterozigotnih mutacij v genih, sicer povezanih z recesivnimi oblikami PB, še vedno ni povsem pojasnjena (Klein in sod., 2007). Znaki parkinsonizma so bili opisani tudi pri nosilcih

heterozigotne mutacije v genu *ATP13A2* v čilenski družini (Ramirez in sod., 2006) in pri dveh bolnikih s tipično PB in heterozigotno mutacijo *ATP13A2* (Di Fonzo in sod., 2007). Naši rezultati ne podpirajo patološke vloge heterozigotnih mutacij *ATP13A2* iz omenjenih študij.

Drugih visokopenetrantnih sprememb v dosedaj znanih genih, dodatnih novih genov ali genetskih mehanizmov, odgovornih za nastanek PB, v slovenski populaciji bolnikov z družinsko obliko PN nismo ugotovili.

Pristranosti raziskave so bile sledeče:

Ker je bila naša raziskava retrospektivna in podatki o preiskovancih pridobljeni na osnovi vprašalnika, ne moremo izključiti možnosti morebitnih pristranosti, predvsem zaradi razlik v spominjanju preteklih dogodkov in pri poročanju družinske anamneze.

Pristranost zaradi razlik v spominjanju dogodkov je prisotna vselej, kadar imamo opraviti z raziskavami primerov s kontrolami. Opis preteklih dogodkov (izpostavljenost dejavniku tveganja) se med bolniki in kontrolami razlikuje. Razlog je v tem, da so bolniki bolj pozorni in se bolj natančno spomnijo preteklih dogodkov ter odgovarjajo na vprašanja bolj natančno kot zdravi. Pristranost pri poročanju je bila predhodno preučevana pri raziskavah o PB (Pressley in sod., 2005; Røgberg in sod., 2011), zato obstaja možnost, da pri poročanju družinske pojavnosti prihaja do odstopanj in posledično do napačnih ocen pojavnosti PB in bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah.

Omejitvi naše raziskave sta relativno majhno število bolnikov v asociacijski študiji, kar dopušča možnost, da smo prezrli manjši učinek, ki bi ga z ustrezno večjo skupino bolnikov sicer zaznali, ter razlika v starosti med študijsko in kontrolno skupino preiskovancev v raziskavi družinske anamneze, vendar ocenujemo, da razlika v starosti na poročanje družinske pojavnosti PB ne bi smela pomembno vplivati.

6 SKLEPI

Z raziskavo smo poskušali vzpostaviti celostno integracijo več genomskega nivojev PB na področju javnega zdravja (družinska anamneza, genomska variabilnost visoko-, srednje- in nizkopenetrantnih variant).

Pokazali smo, da družinska anamneza tako za PB kot za bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah (demence, melanom, depresija), pomembno prispeva k napovednemu modelu tveganja za PB in ima zato potencialno pomembno napovedno vrednost za oblikovanje presejalnih programov javnega zdravja. Pozitivno družinsko anamnezo smo ugotovili pri 18,2 % bolnikov v primerjavi z 1,2 % zdravih kontrolnih preiskovancev (OR = 18,2). Na podlagi družinske anamneze za PB in bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah ter okoljskih dejavnikov smo oblikovali napovedni model tveganja in dosegli natančnost 0,76 (AUC). Vključitev družinske pojavnosti PB in bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, je značilno izboljšala moč napovednega modela. S tem smo potrdili prvo hipotezo, da družinska pojavnost PB in bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, predstavlja pomembno orodje za identifikacijo oseb s povečanim genetskim tveganjem za pojav Parkinsonove bolezni.

V družinskih oblikah PB smo ugotovili pomembno vlogo mutacij v genu *GBA*, ki smo jih odkrili v 30 % družinskih primerov bolezni, ne pa tudi pomena aditivnega učinka posameznih nizkopenetrantnih genomskega variant v genih *SNCA*, *LRRK2*, *MAPT*, *STK39*, *RAB25*, *ITGA8*, *SLC41A1* in *HIP1R*. S tem smo deloma potrdili tretjo hipotezo in zavrnili drugo hipotezo.

Za učinkovito zgodnjo identifikacijo posameznikov s povečanim tveganjem za PB bo smiselna integracija vseh nivojev genomske obremenjenosti, kot kažejo naši podatki, predvsem družinske pojavnosti in genomske variabilnosti srednjepenetrantnih (in visokopenetrantnih) variant ob upoštevanju znanih dejavnikov okolja.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Parkinsonova bolezen je druga najpogostejša nevrodegenerativna bolezen, ki postaja vedno bolj pereč problem na področju javnega zdravja. Za usmerjeno preventivno javnozdravstveno delovanje je pomembna identifikacija posameznikov s povečanim tveganjem za nastop bolezni na nivoju populacije. V raznih programih javnega zdravja se za tovrstno identifikacijo kot pomemben genomskega pristop že uporablja ocena družinske anamneze (Valdez in sod., 2010; Yoon in sod., 2009). Dosedanji poskusi integracije nizkopenetrantnih genomskeh variant v napovedne modele so bili razmeroma neuspešni (Hall in sod., 2013; Mittag in sod., 2012).

Za uspešno integracijo genomike v programe javnega zdravja je pomembno celostno razumevanje genomike PB od družinske anamneze do doprinsa genomskeh variant znotraj posameznih skupin bolnikov. V raziskavi smo zbrali demografske podatke o bolnikih in njihovih družinah, opredelili družinsko pojavnost PB in bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, naredili asociacijsko študijo izbranih genomskeh variant in pri izbrani populaciji bolnikov z družinsko obliko PB opravili eksomsko sekvenciranje.

V raziskavo smo vključili 192 bolnikov s PB in 1659 zdravih kontrolnih preiskovancev. Bolnike smo na podlagi družinske obremenitve s PB razdelili v skupine z visokim, srednjim in populacijskim tveganjem. Dodatno smo zbrali podatke o pojavnosti bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah (demenci, depresiji, diabetesu in melanomu). Z namenom pojasnitve genetske nagnjenosti k PB smo analizirali 8 izbranih genomskeh variant v genih *SNCA*, *LRRK2*, *MAPT*, *RAB25*, *STK39*, *SLC41A1*, *HIP1R* in *ITGA8*. Pri izbrani populaciji 20 bolnikov smo uporabili metodo nove generacije sekvenciranja z namenom identifikacije monogenskih vzrokov za PB.

Pokazali smo, da družinska anamneza pomembno prispeva k napovedi tveganja za PB. Pozitivno družinsko anamnezo smo ugotovili pri 18,2 % bolnikov v primerjavi z 1,2 % kontrolnih preiskovancev ($OR = 18,2$, $p < 0,001$). Pri 12 bolnikih (6,3 %) smo odkrili visoko tveganje na podlagi družinske pojavnosti PB. V družinah bolnikov s PB

smo ugotovili pomembno večjo pojavnost demenc ($p < 0,0001$), multiple skleroze ($p = 0,003$), melanoma ($p = 0,002$) in depresije ($p = 0,05$). Od okoljskih dejavnikov tveganja za PB so imeli statistično značilen vpliv dolgotrajna izpostavljenost pesticidom ($OR = 1,87$, $p = 0,02$), kajenje ($OR = 0,15$, $p < 0,001$) in redno uživanje kave ($OR = 0,57$, $p = 0,0003$).

Z napovednim modelom tveganja na podlagi družinske anamneze za PB, družinske anamneze za bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, in okoljskih dejavnikov smo dosegli natančnost 0,76 (AUC). Pozitivna napovedna vrednost modela je znašala 94,1 %, specifičnost 99,5 % in senzitivnost 74,5 %. Vključitev družinske anamneze za PB in bolezni, ki se pogosteje sopojavljajo v družinah, je značilno izboljšala moč napovednega modela, kar je lahko pomembno za prihodnja oblikovanja programov javnega zdravja za prepoznavo posameznikov s povečanim tveganjem za PB.

V naši populaciji bolnikov z družinsko obliko PB smo odkrili pomembno vlogo srednjepenetrantnih genomskeih variant v genu *GBA*, ne pa tudi pomena aditivnega učinka posameznih nizkopenetrantnih genomskeih variant v genih *SNCA*, *LRRK2*, *MAPT*, *STK39*, *RAB25*, *ITGA8*, *SLC41A1* in *HIP1R*. Drugih visokopenetrantnih genomske sprememb v že znanih genih ali novih monogenskih vzrokov za bolezen nismo odkrili.

Za oblikovanje učinkovitih presejalnih programov za zgodnjo identifikacijo posameznikov s povečanim tveganjem za PB bo smiselna integracija vseh nivojev genomske obremenjenosti, kot kažejo naši podatki, predvsem družinske pojavnosti in genomske variabilnosti srednjepenetrantnih (in visokopenetrantnih) variant ob upoštevanju znanih dejavnikov okolja.

7.2 SUMMARY

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disease in the world and as such an important public health burden. Identification of healthy individuals at risk of developing the disease is needed for successful implementation of preventive public health strategies. Different public health programmes already use family history as an important genomic tool for detecting individuals at risk (Valdez et al., 2010; Yoon et al., 2009). So far, attempts of integration of low penetrant genomic variants into risk prediction models were relatively unsuccessful (Hall et al., 2013; Mittag et al., 2012).

Successful integration of PD genomics into public health programmes requires global understanding of PD genomics – from family history to contribution of different genomic variants. We analyzed family history of PD and associated disorders, performed an association analysis on selected genomic polymorphisms and performed exome sequencing in a selected set of patients with familial PD.

The study population consisted of 192 PD patients and 1659 healthy individuals. Based on family history data we divided patients into further subgroups of high, medium and population risk. Additionally, we analyzed data of family history of associated disorders (dementia, depression, melanoma, diabetes). In our association study we analyzed contribution of 8 selected genomic polymorphisms in genes *SNCA*, *LRRK2*, *MAPT*, *RAB25*, *STK39*, *SLC41A1*, *HIP1R* and *ITGA8* in order to explain familial aggregation of the disease through analyzing cumulative effect of contributions of all analyzed genotypes. In a selected set of 20 patients with familial PD we performed exome sequencing.

Our data shows that family history represents an important risk factor for PD. Positive family history was present in 18.2 % of patients compared to 1.2 % of controls (OR = 18.2, $p < 0.001$). We detected high familial risk (and need for genetic counseling) in 12 patients (6.3 %). In families of PD patients we found significantly higher prevalence of dementia ($p < 0.0001$), multiple sclerosis ($p = 0.003$), melanoma ($p = 0.002$) and depression ($p = 0.05$). As for known environmental risk factors for PD, exposure to pesticides was associated with higher risk for PD, while smoking and coffee consumption were associated with lower risk for PD.

By using cross-validation approach we constructed risk prediction model for PD. By constructing prediction model based on family history of PD, family history of associated disorders and selected environmental factors we achieved discriminatory capacity of 0.76 (AUC). Introducing family history of PD and that of associated disorders significantly improved predictive capacity of risk model, which could be of value in future development of public health programmes for risk identification.

In our population of patients with familial PD we identified important role of middle penetrant variants in gene *GBA* (using exome-sequencing approach), but no role of cumulative effect of analyzed common low penetrant genomic variants in genes *SNCA*, *LRRK2*, *MAPT*, *STK39*, *RAB25*, *ITGA8*, *SLC41A1* and *HIP1R*. In our population of patients with familial PD we found no other mutations in previously known genes or new monogenic causes of disease.

In order to develop efficient public health screening programmes for early identification of healthy individuals at risk for developing PD, integration of all genomic levels would be needed; as our data shows, that would be particularly family history assessment and genomic variability of middle (and high) penetrant genomic variants, taking into consideration the known effects of environmental risk factors for PD.

8 VIRI

- Ahmed I., Tamouza R., Delord M., Krishnamoorthy R., Tzourio C., Mulot C., Nacfer M., Lambert J.-C., Beaune P., Laurent-Puig P., Loriot M.-A., Charron D., Elbaz A. 2012. Association between Parkinson's disease and the HLA-DRB1 locus. *Movement Disorders*, 27: 1104–1110
- Anheim M., Elbaz A., Lesage S., Durr A., Condroyer C., Viallet F., Pollak P., Bonaïti B., Bonaïti-Pellié C., Brice A. 2012. Penetrance of Parkinson disease in glucocerebrosidase gene mutation carriers. *Neurology*, 78: 417–420
- Asselta R., Rimoldi V., Siri C., Cilia R., Guella I., Tesel S., Solda G., Pezzoli G., Duga S., Goldwurm S. 2014. Glucocerebrosidase mutations in primary parkinsonism. *Parkinsonism and Related Disorders*, 20, 11: 1215–1220
- Bamshad M.J., Ng S.B., Bigham A.W., Tabor H.K., Emond M.J., Nickerson D.A., Shendure J. 2011. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nature Reviews Genetics*, 12: 744–755
- Barun B., Brinar V. V., Zadro I., Lusić I., Radović D., Habek M. 2008. Parkinsonism and multiple sclerosis--is there association? *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 110: 958–961
- Beavan M.S., Schapira A.H. 2013. Glucocerebrosidase mutations and the pathogenesis of Parkinson disease. *Annals of Medicine*, 45: 511–521
- Belin A.C., Westerlund M., Sydow O., Lundströmer K., Håkansson A., Nissbrandt H., Olson L., Galter D. 2006. Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) mutations in a Swedish Parkinson cohort and a healthy nonagenarian. *Movement Disorders*, 21: 1731–1734
- Bender A., Krishnan K.J., Morris C.M., Taylor G.A., Reeve A.K., Perry R.H., Jaros E., Hersheson J.S., Betts J., Klopstock T., Taylor R.W., Turnbull D.M. 2006. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature Genetics*, 38: 515–517
- Berg D., Marek K., Ross G.W., Poewe W. 2012. Defining at-risk populations for Parkinson's disease: lessons from ongoing studies. *Movement Disorders*, 27: 656–665
- Berg D., Schweitzer K.J., Leitner P., Zimprich A., Lichtner P., Belcredi P., Brüssel T., Schulte C., Maass S., Nägele T., Wszolek Z.K., Gasser T. 2005. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease. *Brain*, 128: 3000–3011
- Bertoni J.M., Arlette J.P., Fernandez H.H., Fitzer-Attas C., Frei K., Hassan M.N., Isaacson S.H., Lew M.F., Molho E., Ondo W.G., Phillips T.J., Singer C., Sutton J.P., Wolf J.E. 2010. Increased melanoma risk in Parkinson disease: a prospective clinicopathological study. *Archives of Neurology*, 67: 347–352

- Boomsma D.I., Wijmenga C., Slagboom E.P., Swertz M.A., Karssen L.C., Abdellaoui A., Ye K., Guryev V., Vermaat M., van Dijk F., Francioli L.C., Hottenga J.J., Laros J.F., Li Q., Li Y., Cao H., Chen R., Du Y., Li N., Cao S., van Setten J., Menelaou A., Pulit S.L., Hehir-Kwa J.Y., Beekman M., Elbers C.C., Byelas H., de Craen A.J., Deelen P., Dijkstra M., den Dunnen J.T., de Knijff P., Houwing-Duistermaat J., Koval V., Estrada K., Hofman A., Kanterakis A., Enckevort Dv., Mai H., Kattenberg M., van Leeuwen E.M., Neerincx P.B., Oostra B., Rivadeneira F., Suchiman E.H., Uitterlinden A.G., Willemsen G., Wolffenbuttel B.H., Wang J., de Bakker P.I., van Ommen G.J., van Duijn C.M. 2014. The genome of the Netherlands: design, and project goals. European Journal of Human Genetics, 22: 221–227
- Borry P., van Hellemond R.E., Sprumont D., Jales C.F.D., Rial-Sebbag E., Spranger T.M., Curren L., Kaye J., Nys H., Howard H. 2012. Legislation on direct-to-consumer genetic testing in seven European countries. European Journal of Human Genetics, 20, 7: 715–721
- Bras J.M., Singleton A.B. 2011. Exome sequencing in Parkinson's disease. Clinical Genetics, 80: 104–109
- Burbulla L.F., Krüger R. 2011. Converging environmental and genetic pathways in the pathogenesis of Parkinson's disease. Journal of Neurological Sciences, 306: 1–8
- CDC. 2014. Family health history. Atlanta, CDC-Center for Disease Control and Prevention: 3 str.
<http://www.cdc.gov/genomics/famhistory/> (februar 2015)
- CEGAT. 2015. Neurodegenerative diseases. Tübingen, CEGAT-Center for Genomics and Transcriptomics: 19 str.
<http://www.cegat.de/en/services/diagnostic-panels/neurodegenerative-diseases/> (februar 2015)
- CENTOGENE. 2013. Parkinson disease panel. Rostock, CENTOGENE AG: Center for Genomics and Transcriptomics: 2 str.
https://www.centogene.com/centogene/centogene-test-catalogue-detail.php?test=NGS&ID=20110&search=Panel&disease=Parkinsons_disease_panel (februar 2015)
- Cereda E., Barichella M., Pedrolli C., Klerys C., Cassani E., Caccialanza R., Pezzoli G. 2011. Diabetes and risk of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. Diabetes Care, 34: 2614–2623
- Chiara G., Marcocci M.E., Sgarbanti R., Civitelli L., Ripoli C., Piacentini R., Garaci E., Grassi C., Palamara A.T. 2012. Infectious agents and neurodegeneration. Molecular Neurobiology, 46: 614–638
- Cingolani P., Platts A., Wang L.L., Coon M., Nguyen T., Wang L., Land S.J., Lu X., Ruden D.M. 2012. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff. Fly, 6, 2: 80–92

- Coppedè F. 2012. Genetics and epigenetics of Parkinson's disease. *Scientific World Journal*, 2012: 489830, doi:10.1100/2012/489830: 12 str.
- Cooper D.N., Ball E.V., Stenson P.D., Phillips A.D., Howells K., Heywood S., Mort M.E., Horan M.P. 2015. HGMD - The Human Gene Mutation Database. Cardiff, Cardiff University: baza podatkov
<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (februar 2015)
- Corti O., Lesage S., Brice A. 2011. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's Disease. *Physiological Reviews*, 91, 4: 1161–1218
- Coskun P., Wyrembak J., Schriner S.E., Chen H.W., Marciniack C., Laferla F., Wallace D.C. 2012. A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1820, 5: 553–564
- Crosiers D., Theuns J., Cras P., van Broeckhoven C. 2011. Parkinson disease: Insights in clinical, genetic and pathological features of monogenic disease subtypes. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 42, 2: 131–141
- Cummings J.L. 1992. Depression and Parkinson's disease: A review. *American Journal of Psychiatry*, 149: 443–454
- Davydov E. V., Goode D.L., Sirota M., Cooper G.M., Sidow A., Batzoglou S. 2010. Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++. *PLoS Computational Biology*, 6, 12: e1001025, doi:10.1371/journal.pcbi.1001025: 13 str.
- DePristo M.A., Banks E., Poplin R., Garimella K. V., Maguire J.R., Hartl C., Philippakis A.A., del Angel G., Rivas M.A., Hanna M., McKenna A., Fennell T.J., Kernytsky A.M., Sivachenko A.Y., Cibulskis K., Gabriel S.B., Altshuler D., Daly M.J. 2011. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 43: 491–498
- Di Fonzo A., Chien H.F., Socal M., Giraudo S., Tassorelli C., Iliceto G., Fabbrini G., Marconi R., Fincati E., Abbruzzese G., Marini P., Squitieri F., Horstink M.W., Montagna P., Libera A.D., Stocchi F., Goldwurm S., Ferreira J.J., Meco G., Martignoni E., Lopiano L., Jardim L.B., Oostra B.A., Barbosa E.R., Bonifati V. 2007. ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology*, 68, 19: 1557–1562
- Dick F.D., De Palma G., Ahmadi A., Scott N.W., Prescott G.J., Bennett J., Semple S., Dick S., Counsell C., Mozzoni P., Haines N., Wettinger S.B., Mutti A., Otelea M., Seaton A., Söderkvist P., Felice A. 2007. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occupational and Environmental Medicine*, 64: 666–672
- Djarmati A., Hagenah J., Reetz K., Winkler S., Behrens M.I., Pawlack H., Lohmann K., Ramirez A., Tadić V., Brüggemann N., Berg D., Siebner H.R., Lang A.E., Pramstaller P.P., Binkofski F., Kostić V.S., Volkmann J., Gasser T., Klein C. 2009. ATP13A2 variants in early-onset Parkinson's disease patients and controls. *Movement Disorders*, 24: 2104–2111

- Dorsey E.R., Constantinescu R., Thompson J.P., Biglan K.M., Holloway R.G., Kieburtz K., Marshall F.J., Ravina B.M., Schifitto G., Siderowf A., Tanner C.M. 2007. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68: 384–386
- European Society of Human Genetics. 2010. Statement of the ESHG on direct-to-consumer genetic testing for health-related purposes. *European Journal of Human Genetics*, 18: 1271–1273
- ExAC. 2014. Exac Browser (Beta) / Exome Aggregation Consortium. Cambridge, The Exome Aggregation Consortium: 1 str.
<http://exac.broadinstitute.org> (februar 2015)
- Fahim S., van Duijn C.M., Baker F.M., Launer L., Breteler M.M., Schudel W.J., Hofman A. 1998. A study of familial aggregation of depression, dementia and Parkinson's disease. *European Journal of Epidemiology*, 14: 233–238
- Gao H.M., Hong J.S. 2011. Gene-environment interactions: key to unraveling the mystery of Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 94: 1–19
- Gao X., Simon K.C., Han J., Schwarzschild M.A., Ascherio A. 2009. Family history of melanoma and Parkinson disease risk. *Neurology*, 73: 1286–1291
- GENDIA. 2015. Next generation and Sanger sequencing platforms. Antwerp, GENDIA-GENetic DIAgnostic Network: 56 str.
http://www.gendia.net/tests_tab20.html (februar 2015)
- Glass A.S., Huynh D.P., Franck T., Woitalla D., Müller T., Pulst S.M., Berg D., Krüger R., Riess O. 2004. Screening for mutations in synaptotagmin XI in Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*, 68: 21–28
- Gorell J.M., Peterson E.L., Rybicki B.A., Johnson C.C. 2004. Multiple risk factors for Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 217: 169–174
- Gourraud P.A., McElroy J.P., Caillier S.J., Johnson B.A., Santaniello A., Hauser S.L., Oksenberg J.R. 2011. Aggregation of multiple sclerosis genetic risk variants in multiple and single case families. *Annals of Neurology*, 69: 65–74
- Grunblatt E. 2008. Commonalities in the genetics of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 8: 1865–1877
- Hall T.O., Wan J.Y., Mata I.F., Kerr K.F., Snapinn K.W., Samii A., Roberts J.W., Agarwal P., Zabetian C.P., Edwards K.L. 2013. Risk prediction for complex diseases: application to Parkinson disease. *Genetics in Medicine*, 15: 361–367
- Hamza T.H., Zabetian C.P., Tenesa A., Laederach A., Montimurro J., Yearout D., Kay D.M., Doheny K.F., Paschall J., Pugh E., Kusel V.I., Collura R., Roberts J., Griffith A., Samii A., Scott W.K., Nutt J., Factor S.A., Payami H. 2010. Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease. *Nature Genetics*, 42: 781–785

- Hauser S.L., Oksenberg J.R. 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*, 52: 61–76
- Hernán M.A., Zhang S.M., Lipworth L., Olek M.J., Ascherio A. 2001. Multiple sclerosis and age at infection with common viruses. *Epidemiology*, 12: 301–306
- Houlden H., Singleton A.B. 2012. The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica*, 124: 325–338
- Howard H.C., Avard D., Barry P. 2011. Are the kids really all right? Direct-to-consumer genetic testing in children: are company policies clashing with professional norms? *European Journal of Human Genetics*, 19: 1122–1126
- Howard H.C., Barry P. 2012. Is there a doctor in the house?: The presence of physicians in the direct-to-consumer genetic testing context. *Journal of Community Genetics*, 3: 105–112
- Hu G., Jousilahti P., Bidel S., Antikainen R., Tuomilehto J. 2007. Type 2 diabetes and the risk of Parkinson's disease. *Diabetes Care*, 30: 842–847
- Huang X., Chen P.C., Poole C. 2004. APOE-[epsilon]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology*, 62: 2198–2202
- Hughes A.J., Daniel S.E., Kilford L., Lees A.J. 1992. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 55, 3: 181–184
- Huynh D.P., Scoles D.R., Nguyen D., Pulst S.M. 2003. The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Human Molecular Genetics*, 12: 2587–2897
- Ideker T., Galitski T., Hood L. 2001. A new approach to decoding life: systems biology. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2: 343–372
- Ionita-Laza I., Lee S., Makarov V., Buxbaum J., Lin X. 2013. Sequence kernel association tests for the combined effect of rare and common variants. *American Journal of Human Genetics*, 92: 841–853
- Kaye J. 2008. The regulation of direct-to-consumer genetic tests. *Human Molecular Genetics*, 17: R180–R183
- Kieburtz K., Wunderle K.B. 2013. Parkinson's disease: evidence for environmental risk factors. *Movement Disorders*, 28: 8–13
- Klein C., Djarmati A. 2011. Parkinson disease: genetic testing in Parkinson disease—who should be assessed? *Nature Reviews Neurology*, 7, 1: 7–9
- Klein C., Lohmann-Hedrich K., Rogava E., Schlossmacher M.G., Lang A.E. 2007. Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *Lancet Neurology*, 6: 652–662

- Klein C., Westenberger A. 2012. Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, 1: a008888, doi: 10.1101/cshperspect.a008888: 15 str.
- Klimek P., Kautzky-Willer A., Chmiel A., Schiller-Fröhwirth I., Thurner S. 2015. Quantification of diabetes comorbidity risks across life using nation-wide big claims data. *PLoS Computational Biology*, 11, 4: e1004125, doi:10.1371/journal.pcbi.1004125: 16 str.
- Köhler S., Doelken S.C., Mungall C.J., Bauer S., Firth H. V, Bailleul-Forestier I., Black G.C.M., Brown D.L., Brudno M., Campbell J., FitzPatrick D.R., Eppig J.T., Jackson A.P., Freson K., Girdea M., Helbig I., Hurst J.A., Jähn J., Jackson L.G., Kelly A.M., Ledbetter D.H., Mansour S., Martin C.L., Moss C., Mumford A., Ouwehand W.H., Park S.M., Riggs E.R., Scott R.H., Sisodiya S., Van Vooren S., Wapner R.J., Wilkie A.O.M., Wright C.F., Vulto-van Silfhout A.T., Leeuw N. de, de Vries B.B.A., Washington N.L., Smith C.L., Westerfield M., Schofield P., Ruef B.J., Gkoutos G. V, Haendel M., Smedley D., Lewis S.E., Robinson P.N. 2014. The Human Phenotype Ontology project: linking molecular biology and disease through phenotype data. *Nucleic Acids Research*, 42: D966–D974
- Kruppa J., Ziegler A., König I.R. 2012. Risk estimation and risk prediction using machine-learning methods. *Human Genetics*, 131, 10: 1639–1654
- Ku C.-S., Naidoo N., Pawitan Y. 2011. Revisiting Mendelian disorders through exome sequencing. *Human Genetics*, 129: 351–370
- Kumar K.R., Lohmann K., Klein C. 2012a. Genetics of Parkinson disease and other movement disorders. *Current Opinion in Neurology*, 25: 466–474
- Kumar K.R., Weissbach A., Heldmann M., Kasten M., Tunc S., Sue C.M., Svetel M., Kostić V.S., Segura-Aguilar J., Ramirez A., Simon D.K., Vieregge P., Münte T.F., Hagenah J., Klein C., Lohmann K. 2012b. Frequency of the D620N mutation in VPS35 in Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 69: 1360–1364
- Kwok J.B. 2010. Role of epigenetics in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Epigenomics*, 2, 5: 671-682
- Lai H.J., Lin C.H., Wu R.M. 2012. Early-onset autosomal-recessive parkinsonian-pyramidal syndrome. *Acta Neurologica Taiwanica*, 21, 3: 99–107
- Landrum M.J., Lee J.M., Riley G.R., Jang W., Rubinstein W.S., Church D.M., Maglott D.R. 2014. ClinVar: Public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Research*, 42: D980–D985
- Lautier C., Goldwurm S., Dürr A., Giovannone B., Tsiaras W.G., Pezzoli G., Brice A., Smith R.J. 2008. Mutations in the GIGYF2 (TNRC15) Gene at the PARK11 locus in familial Parkinson disease. *American Journal of Human Genetics*, 82: 822–833

- Leentjens A.F.G., Van den Akker M., Metsemakers J.F.M., Lousberg R., Verhey F.R.J. 2003. Higher incidence of depression preceding the onset of Parkinson's disease: A register study. *Movement Disorders*, 18: 414–418
- Lill C.M., Roehr J.T., McQueen M.B., Kavvoura F.K., Bagade S., Schjeide B.M.M., Schjeide L.M., Meissner E., Zauf U., Allen N.C., Liu T., Schilling M., Anderson K.J., Beecham G., Berg D., Biernacka J.M., Brice A., DeStefano A.L., Do C.B., Eriksson N., Factor S.A., Farrer M.J., Foroud T., Gasser T., Hamza T., Hardy J.A., Heutink P., Hill-Burns E.M., Klein C., Latourelle J.C., Maraganore D.M., Martin E.R., Martinez M., Myers R.H., Nalls M.A., Pankratz N., Payami H., Satake W., Scott W.K., Sharma M., Singleton A.B., Stefansson K., Toda T., Tung J.Y., Vance J., Wood N.W., Zabetian C.P., Young P., Tanzi R.E., Khouri M.J., Zipp F., Lehrach H., Ioannidis J.P., Bertram L. 2012. Comprehensive research synopsis and systematic meta-analyses in Parkinson's disease genetics: The PDGene database. *PLoS Genetics*, 8, 3: e1002548, doi:10.1371/journal.pgen.1002548: 10 str.
- Liu R., Gao X., Lu Y., Chen H. 2011. Meta-analysis of the relationship between Parkinson disease and melanoma. *Neurology*, 76: 2002–2009
- Liu R., Guo X., Park Y., Huang X., Sinha R., Freedman N.D., Hollenbeck A.R., Blair A., Chen H. 2012. Caffeine intake, smoking, and risk of Parkinson disease in men and women. *American Journal of Epidemiology*, 175: 1200–1207
- Liu X., Jian X., Boerwinkle E. 2013. dbNSFP v2.0: A database of human non-synonymous SNVs and their functional predictions and annotations. *Human Mutation*, 34, 9: E2393–E2402
- Lohmann K., Klein C. 2008. Genetics of Parkinson disease. *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, 14, 2: 90–113
- Marder K., Tang M.X., Alfaro B., Mejia H., Cote L., Louis E., Stern Y., Mayeux R. 1999. Risk of Alzheimer's disease in relatives of Parkinson's disease patients with and without dementia. *Neurology*, 52: 719–724
- Martin I., Dawson V.L., Dawson T.M. 2011. Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 12: 301–325
- McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytsky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., DePristo M.A. 2010. The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20: 1297–1303
- Metzker M.L. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11: 31–46
- Mittag F., Büchel F., Saad M., Jahn A., Schulte C., Bochdanovits Z., Simón-Sánchez J., Nalls M.A., Keller M., Hernandez D.G., Gibbs J.R., Lesage S., Brice A., Heutink P., Martinez M., Wood N.W., Hardy J., Singleton A.B., Zell A., Gasser T., Sharma M. 2012. Use of support vector machines for disease risk prediction

in genome-wide association studies: concerns and opportunities. *Human Mutation*, 33: 1708–18

Nalls M.A., Plagnol V., Hernandez D.G., Sharma M., Sheerin U.M., Saad M., Simon-Sanchez J., Schulte C., Lesage S., Sveinbjornsdottir S., Stefansson K., Martinez M., Hardy J., Heutink P., Brice A., Gasser T., Singleton A.B., Wood N.W. 2011. Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *Lancet*, 377: 641–649

Ng S.B., Nickerson D.A., Bamshad M.J., Shendure J. 2010. Massively parallel sequencing and rare disease. *Human Molecular Genetics*, 19: R119–R124

Nishioka K., Hayashi S., Farrer M.J., Singleton A.B., Yoshino H., Imai H., Kitami T., Sato K., Kuroda R., Tomiyama H., Mizoguchi K., Murata M., Toda T., Imoto I., Inazawa J., Mizuno Y., Hattori N. 2006. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 59: 298–309

Nishioka K., Ross O.A., Ishii K., Kachergus J.M., Ishiwata K., Kitagawa M., Kono S., Obi T., Mizoguchi K., Inoue Y., Imai H., Takanashi M., Mizuno Y., Farrer M.J., Hattori N. 2009. Expanding the clinical phenotype of SNCA duplication carriers. *Movement Disorders*, 24: 1811–1819

Obeso J.A., Rodriguez-Oroz M.C., Goetz C.G., Marin C., Kordower J.H., Rodriguez M., Hirsch E.C., Farrer M., Schapira A.H., Halliday G. 2010. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nature Medicine*, 16: 653–661

Olanow C.W., Obeso J.A. 2012. The significance of defining preclinical or prodromal Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 27: 666–669

Olsen J.H., Friis S., Frederiksen K., McLaughlin J.K., Mellemkjaer L., Møller H. 2005. Atypical cancer pattern in patients with Parkinson's disease. *British Journal of Cancer*, 92: 201–205

Oti M., Brunner H.G. 2007. The modular nature of genetic diseases. *Clinical Genetics*, 71, 1: 1–11

Paisán-Ruiz C., Houlden H. 2010. Common pathogenic pathways in melanoma and Parkinson disease. *Neurology*, 75, 18: 1653–1655

Peeraully T., Tan E.K. 2012. Genetic variants in sporadic Parkinson's disease: East vs West. *Parkinsonism and Related Disorders*, 18, 1: S63–S65

Pressley J.C., Tang M.-X., Marder K., Cote L.J., Mayeux R. 2005. Disparities in the recording of Parkinson's disease on death certificates. *Movement Disorders*, 20: 315–321

- Priyadarshi A., Khuder S.A., Schaub E.A., Priyadarshi S.S. 2001. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environmental Research*, 86: 122–127
- Przedborski S. 2010. Inflammation and Parkinson's disease pathogenesis. *Movement Disorders*, 25, 1: S55–S57
- Ramirez A., Heimbach A., Gründemann J., Stiller B., Hampshire D., Cid L.P., Goebel I., Mubaidin A.F., Wriegat A.L., Roeper J., Al-Din A., Hillmer A.M., Karsak M., Liss B., Woods C.G., Behrens M.I., Kubisch C. 2006. Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nature Genetics*, 38: 1184–1191
- Rocca W.A., McDonnell S.K., Strain K.J., Bower J.H., Ahlskog J.E., Elbaz A., Schaid D.J., Maraganore D.M. 2004. Familial aggregation of Parkinson's disease: The Mayo clinic family study. *Annals of Neurology*, 56: 495–502
- Rosen A.R., Steenland N.K., Hanfelt J., Factor S.A., Lah J.J., Levey A.I. 2007. Evidence of shared risk for Alzheimer's disease and Parkinson's disease using family history. *Neurogenetics*, 8: 263–270
- Ross O.A., Soto-Ortolaza A.I., Heckman M.G., Aasly J.O., Abahuni N., Annesi G., Bacon J.A., Bardien S., Bozi M., Brice A., Brighina L., Van Broeckhoven C., Carr J., Chartier-Harlin M.C., Dardiotis E., Dickson D.W., Diehl N.N., Elbaz A., Ferrarese C., Ferraris A., Fiske B., Gibson J.M., Gibson R., Hadjigeorgiou G.M., Hattori N., Ioannidis J.P.A., Jasinska-Myga B., Jeon B.S., Kim Y.J., Klein C., Kruger R., Kyrtazi E., Lesage S., Lin C.H., Lynch T., Maraganore D.M., Mellick G.D., Mutez E., Nilsson C., Opala G., Park S.S., Puschmann A., Quattrone A., Sharma M., Silburn P.A., Sohn Y.H., Stefanis L., Tadic V., Theuns J., Tomiyama H., Uitti R.J., Valente E.M., van de Loo S., Vassilatis D.K., Vilariño-Güell C., White L.R., Wirdefeldt K., Wszolek Z.K., Wu R.M., Farrer M.J. 2011. Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurology*, 10: 898–908
- Roussel B.D., Kruppa A.J., Miranda E., Crowther D.C., Lomas D.A., Marciniak S.J. 2013. Endoplasmic reticulum dysfunction in neurological disease. *Lancet Neurology*, 12: 105–118
- Rugbjerg K., Friis S., Lassen C.F., Ritz B., Olsen J.H. 2012. Malignant melanoma, breast cancer and other cancers in patients with Parkinson's disease. *International Journal of Cancer*, 131: 1904–1911
- Rugbjerg K., Harris M.A., Shen H., Marion S.A., Tsui J.K.C., Teschke K. 2011. Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease--a population-based case-control study evaluating the potential for recall bias. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 37: 427–436
- Rybicki B.A., Johnson C.C., Peterson E.L., Kortsha G.X., Gorell J.M. 1999. A family history of Parkinson's disease and its effect on other PD risk factors. *Neuroepidemiology*, 18: 270–278

- Sadnicka A., Sheerin U.M., Kaplan C., Molloy S., Muraro P.A. 2013. Primary progressive multiple sclerosis developing in the context of young onset Parkinson's disease. *Multiple Sclerosis Journal*, 19: 123–125
- San Lucas F.A., Wang G., Scheet P., Peng B. 2012. Integrated annotation and analysis of genetic variants from next-generation sequencing studies with variant tools. *Bioinformatics*, 28: 421–422
- Savica R., Rocca W.A., Ahlskog J.E. 2010. When does Parkinson disease start? *Archives of Neurology*, 67: 798–801
- Sharma M., Ioannidis J.P., Aasly J.O., Annesi G., Brice A., Van Broeckhoven C., Bertram L., Bozi M., Crosiers D., Clarke C., Facheris M., Farrer M., Garraux G., Gispert S., Auburger G., Vilariño-Güell C., Hadjigeorgiou G.M., Hicks A.A., Hattori N., Jeon B., Lesage S., Lill C.M., Lin J.J., Lynch T., Lichtner P., Lang A.E., Mok V., Jasinska-Myga B., Mellick G.D., Morrison K.E., Opala G., Pramstaller P.P., Pichler I., Park S.S., Quattrone A., Rogaeva E., Ross O.A., Stefanis L., Stockton J.D., Satake W., Silburn P.A., Theuns J., Tan E.K., Toda T., Tomiyama H., Uitti R.J., Wirdefeldt K., Wszolek Z., Xiromerisiou G., Yueh K.C., Zhao Y., Gasser T., Maraganore D., Krüger R. 2012. Large-scale replication and heterogeneity in Parkinson disease genetic loci. *Neurology*, 79: 659–667
- Sidransky E., Nalls M.A., Aasly J.O., Aharon-Peretz J., Annesi G., Barbosa E.R., Bar-Shira A., Berg D., Bras J., Brice A., Chen C.M., Clark L.N., Condroyer C., De Marco E.V., Dürr A., Eblan M.J., Fahn S., Farrer M.J., Fung H.C., Gan-Or Z., Gasser T., Gershoni-Baruch R., Giladi N., Griffith A., Gurevich T., Januario C., Kropp P., Lang A.E., Lee-Chen G.-J., Lesage S., Marder K., Mata I.F., Mirelman A., Mitsui J., Mizuta I., Nicoletti G., Oliveira C., Ottman R., Orr-Utreger A., Pereira L.V., Quattrone A., Rogaeva E., Rolfs A., Rosenbaum H., Rozenberg R., Samii A., Samaddar T., Schulte C., Sharma M., Singleton A., Spitz M., Tan E.K., Tayebi N., Toda T., Troiano A.R., Tsuji S., Wittstock M., Wolfsberg T.G., Wu Y.R., Zabetian C.P., Zhao Y., Ziegler S.G. 2009. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*, 361: 1651–1661
- Singleton A.B., Farrer M.J., Bonifati V. 2013. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Movement Disorders*, 28: 14–23
- Skeie G.O., Muller B., Haugarvoll K., Larsen J.P., Tysnes O.B. 2013. Parkinson disease: associated disorders in the Norwegian population based incident ParkWest study. *Parkinsonism and Related Disorders*, 19: 53–55
- Stadelmann C. 2011. Multiple sclerosis as a neurodegenerative disease: pathology, mechanisms and therapeutic implications. *Current Opinion in Neurology*, 24: 224–229
- Swan M., Saunders-Pullman R. 2013. The association between β-glucocerebrosidase mutations and parkinsonism. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 13, 8: 368, doi:10.1007/s11910-013-0368-x: 16 str.

- Tan E.K., Kwok H.H., Kwok H.K., Tan L.C., Zhao W.T., Prakash K.M., Au W.L., Pavanni R., Ng Y.Y., Satake W., Zhao Y., Toda T., Liu J.J. 2010. Analysis of GWAS-linked loci in Parkinson disease reaffirms PARK16 as a susceptibility locus. *Neurology*, 75: 508–512
- Tan E.K., Skipper L.M. 2007. Pathogenic mutations in Parkinson disease. *Human Mutation*, 28, 7: 641–653
- Taylor C.A., Cupples L.A., Thomas C.A., Burchard A.E., Feldman R.G., Myers R.H. 1999. Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease : A New England-based case control study. *American Journal of Medical Genetics*, 88, 6: 742–749
- Thacker E.L., Ascherio A. 2008. Familial aggregation of Parkinson's disease: a meta-analysis. *Movement Disorders*, 23: 1174–1183
- Trapp B.D., Nave K.A. 2008. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annual Review of Neuroscience*, 31: 247–269
- UK10K. 2011. Rare genetic variants in health and disease (2010-2013). Hinxton, Wellcome Trust Sanger Institute: 1 str.
<http://www.uk10k.org/> (februar 2015)
- The UniProt Consortium 2015. Uniprot: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 43: D204–D212
- Trinh J., Farrer M. 2013. Advances in the genetics of Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*, 9: 445–454
- Valdez R., Yoon P.W., Qureshi N., Green R.F., Khoury M.J. 2010. Family history in public health practice: a genomic tool for disease prevention and health promotion. *Annual Review of Public Health*, 31: 69–87
- Valkovic P., Krastev G., Mako M., Leitner P., Gasser T. 2007. A unique case of coincidence of early onset Parkinson's disease and multiple sclerosis. *Movement Disorders*, 22: 2278–2281
- Van Maele-Fabry G., Hoet P., Vilain F., Lison D. 2012. Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environment International*, 46: 30–43
- Vrečar I., Maver A., Pirtošek Z., Georgiev D., Klemenc Ketš Z., Peterlin B. 2015a. Family history based approach in risk prediction for Parkinson's disease: additional contribution of familial associated disorders. *Genetika (Beograd)*, 47, 1: 303–310
- Vrečar I., Peterlin B., Teran N., Lovrecic L. 2015b. Direct-to-consumer genetic testing in Slovenia: availability, ethical dilemmas and legislation. *Biochimica Medica*, 25, 1: 84–89

- Wang K., Li M., Hakonarson H. 2010. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. Nucleic Acids Research, 38, 16: e164
- Wermuth L., Bech P. 2006. Letter to the editor: Depression in Parkinson's disease - a review. Acta Neurologica Scandinavica, 114, 5: 360–360
- Wilhelms M.M.M., van der Pol S.M.A., Jansen Q., Witte M.E., van der Valk P., Rozemuller A.J.M., Drukarch B., de Vries H.E., Van Horssen J. 2011. Association of Parkinson disease-related protein PINK1 with Alzheimer disease and multiple sclerosis brain lesions. Free Radical Biology and Medicine, 50: 469–476
- Wirdefeldt K., Adami H.O., Cole P., Trichopoulos D., Mandel J. 2011. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. European Journal of Epidemiology, 26, 1: S1–58
- Witte M.E., Bol J.G.J.M., Gerritsen W.H., van der Valk P., Drukarch B., van Horssen J., Wilhelms M.M.M. 2009. Parkinson's disease-associated parkin colocalizes with Alzheimer's disease and multiple sclerosis brain lesions. Neurobiology of Disease, 36: 445–452
- Wüllner U., Klockgether T. 2003. Inflammation in Parkinson's disease. Journal of Neurology, 250, 1: I35–I38
- Yan M.H., Wang X., Zhu X. 2013. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. Free Radical Biology and Medicine, 62: 90–101
- Yoon P.W., Scheuner M.T., Jorgensen C., Khouri M.J. 2009. Developing Family healthware, a family history screening tool to prevent common chronic diseases. Preventing Chronic Disease, 6, 1: A33
http://www.cdc.gov/pcd/issues/2009/jan/07_0268.htm (februar 2015)

ZAHVALA

Na prvem mestu se iskreno zahvaljujem svojemu mentorju prof. dr. Borutu Peterlinu za motivacijo, strokovne nasvete, vzpodbudo ter njegovo dostopnost ob nastajanju tega dela.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Zvezdanu Pirtošku, dr. Dejanu Georgievu in Lidiji Ocepek za prijaznost in pomoč pri delu z bolniki ter za uspešno sodelovanje pri vključevanju bolnikov v raziskavo.

Zahvaljujem se vsem sodelavcem Kliničnega inštituta za medicinsko genetiko za družbo, prijateljstvo, pomoč in nasvete. Hvala Andreju Stegnarju in Lili Simeunović za njuno prijazno pomoč pri delu v laboratoriju.

Posebna zahvala gre Alešu Mavru, da mi je med delom prijazno pomagal s številnimi strokovnimi nasveti, ter za njegovo pomoč in podporo pri statistični obdelavi rezultatov.

Zahvaljujem se tudi Mirjani Matić za skrben pregled angleškega dela besedila in njeno podporo med pisanjem disertacije.

Doktorski študij je delno sofinancirala Evropska unija, in sicer iz Evropskega socialnega sklada. Sofinanciranje se izvaja v okviru štipendijskih schem 1. Razvojne prioritete (Spodbujanje podjetništva in prilagodljivosti) Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007-2013.

Največja in najgloblja zahvala gre Lari, Jakobu in Borisu za njihovo neizmerno potrpežljivost, smeh, veselje in srečo.