

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
"FEDERICO II"
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

A.A. 2006/07

XX CICLO

TESI DI DOTTORATO

**STUDIO CLINICO E MOLECOLARE DI
PARKINSONISMI GENETICI IN UNA
POPOLAZIONE DEL SUD ITALIA**

**COORDINATORE
CH.MO PROF.
LUCIO ANNUNZIATO**

**TUTOR
CH.MO PROF.
GIUSEPPE DE MICHELE**

**CANDIDATA
DR.SSA ANNA DE ROSA**

INDICE

INTRODUZIONE:	PAG. 3
PAZIENTI E METODI	PAG. 18
RISULTATI	PAG. 22
DISCUSSIONE	PAG. 29
FIGURE E TABELLE	PAG. 39
FIGURA 1	PAG. 40
FIGURA 2	PAG. 41
FIGURA 3	PAG. 42
FIGURA 4	PAG. 43
FIGURA 5	PAG. 44
TABELLA 1	PAG. 45
FIGURA 6	PAG. 46
BIBLIOGRAFIA	PAG. 47

INTRODUZIONE

La malattia di Parkinson (MP) è il secondo disordine degenerativo più comune dopo la Malattia di Alzheimer. Colpisce più dell'1% degli individui di 55 anni di età e più del 3% di quelli al di sopra dei 75 (de Rijk, 1997). L'incidenza è 13.4/100.000, con una più alta prevalenza tra i maschi (10.0 per 100.000) rispetto alle femmine (9.9 per 100.000) (Van Den Eeden, 2003). La diagnosi di MP è basata sui reperti clinici di tremore, rigidità, bradicinesia e buona risposta al trattamento con l-dopa (Hughes, 2002). Dal punto di vista eziopatogenetico, l'origine della malattia viene attribuita alla degenerazione dei neuroni dopaminergici della pars compacta della substantia nigra mesencefalica, con conseguente riduzione della liberazione di dopamina a livello dello striato. Gli aspetti patologici caratteristici della MP sono costituiti dalla perdita neuronale dopaminergica nella pars compacta della substantia nigra e la presenza di inclusioni intracitoplasmatiche eosinofile definite corpi di Lewy nei restanti neuroni nigrali, costituite da un core centrale maldefinito e da un'area periferica formata da fibrille disposte in maniera radiata (Forno 1996, Braak 2000) (Figura 1).

In base all'età di esordio, si preferisce parlare di Malattia di Parkinson ad esordio giovanile, quando le manifestazioni della patologia si verificano prima dei 21 anni; si definiscono Malattia di Parkinson ad

esordio precoce ed ad esordio tardivo quelle con comparsa dei disturbi prima e dopo i 50 anni rispettivamente.

La Malattia di Parkinson è tipicamente un disordine sporadico, tuttavia il coinvolgimento di fattori genetici nell'eziologia di questa patologia è stato a lungo dibattuto negli ultimi cento anni.

Per esplorare l'ipotesi che i fattori genetici avessero un ruolo nella patogenesi della MP, negli anni '80 vennero condotti alcuni studi su gemelli di pazienti on MP. Gli studi su gemelli permettevano in effetti di verificare l'ipotesi di un ruolo dell'ereditarietà. In caso, infatti, di ruolo significativo dei fattori genetici si sarebbero dovute verificare due condizioni: 1) la concordanza tra gemelli sarebbe dovuta risultare più alta di quella attesa in base alla prevalenza di malattia nella popolazione; 2) nei gemelli monozigoti la concordanza sarebbe dovuta essere più alta che in quelli dizigoti. In particolare la seconda condizione avrebbe permesso di escludere l'ipotesi che un'elevata concordanza fosse solo in relazione a fattori ambientali condivisi tra coppie di gemelli. Questi studi non mostrarono né un'elevata concordanza per MP nelle coppie né una differenza tra monozigoti e dizigoti (Ward CD, 1983; Marsden, 1987; Marttila, 1988).

Pertanto l'ipotesi di un ruolo di fattori genetici nella MP fu per il momento accantonata. Agli inizi degli anni '90 l'argomento fu riconsiderato e le nuove metodiche di genetica molecolare (analisi di

linkage, clonaggio posizionale) furono applicate allo studio della MP. Alcuni studi dimostrarono che il 10-25% dei pazienti aveva almeno un altro membro della famiglia con patologia simile e un'analisi caso-controllo dimostrava che il rischio relativo dei parenti di primo grado dei pazienti parkinsoniani era 3-4 volte più alto di quello dei controlli (Payami H, 1994). Alla fine degli anni '90 fu condotto un nuovo studio epidemiologico su un grosso campione di gemelli che evidenziò una suscettibilità genetica tra gemelli con MP ad esordio precoce (Tanner, 1999). Questi e molti altri lavori hanno suggerito l'ipotesi che la ricorrenza familiare riscontrata possa essere attribuita a forme monogeniche con una trasmissione di tipo mendeliano, con ereditarietà sia di tipo autosomico dominante che recessivo (Broussolle, 1997). Recentemente è stato stimato che il rischio per MP è da 3 a 14 volte più alto nei parenti di primo grado di un individuo affetto rispetto a membri di famiglie non affette (Pankratz 2003).

Fino ad oggi sono stati mappati undici loci e clonati sette geni di MP geneticamente determinata. Di queste forme monogeniche, quattro sono trasmesse con modalità autosomico dominante e quattro sono autosomiche recessive.

Nel corso del nostro dottorato mi sono occupata dello studio clinico e genetico di due forme autosomiche dominanti (PARK1 e PARK8) e due autosomiche recessive (PARK2 e PARK6) di MP.

PARK1

La prima chiara dimostrazione che la malattia di Parkinson potesse avere delle basi genetiche venne nel 1996 quando analisi di linkage permisero di identificare un locus sul braccio lungo del cromosoma 4 in un'ampia famiglia di origini campane emigrata in Nord America ("Contursi kindred"), nella quale era stata riscontrata un forma di parkinsonismo con corpi di Lewy trasmesso con modalità autosomica dominante (Polymeropoulos, 1996). L'anno successivo fu dimostrato che la malattia era causata da una mutazione puntiforme (Ala53Thr), nel gene dell' α -sinucleina (*SNCA*) (Polymeropoulos, 1997). La stessa mutazione fu riscontrata in altre sette famiglie greche, discendenti probabilmente da comuni antenati, alcuni dei quali sarebbero giunti a Contursi in seguito alla colonizzazione greca dell'Italia Meridionale. Successivamente due differenti mutazioni puntiformi Ala30Pro e Glu46Lys nell'ambito del gene dell' α -sinucleina sono state riscontrate rispettivamente in famiglia tedesca e spagnola (Kruge, 1998; Zarranz, 2004). Recenti studi hanno dimostrato che anche moltiplicazioni nella regione contenente il gene *SNCA* siano responsabili di parkinsonismo familiare (Nishioka, 2006; Farrer, 2004). Sono stati, inoltre, individuati dei polimorfismi nel promotore del gene che sarebbero associati con un più alto rischio di sviluppare la malattia (Pals, 2004; Maraganore, 2006; Tan, 2004a).

La forma di parkinsonismo associato alla mutazione Ala53Thr viene trasmessa con penetranza quasi completa (85%). L'età media di insorgenza della malattia negli individui affetti è circa 45 anni; si manifesta con tremore asimmetrico a riposo, rigidità, problemi di equilibrio e difficoltà nella deambulazione. La risposta alla l-dopa è buona, ma la progressione della malattia è piuttosto rapida, visto che il decesso sopravviene in genere dopo circa dieci anni dall'esordio, e precoce è il deterioramento cognitivo (Golbe, 1998). In alcune famiglie portatrici della mutazione Ala53Thr il fenotipo è più ricco di quello riscontrato originalmente nel Cotursi kindred, poiché include mioclono, ipoventilazione centrale ed ipotensione ortostatica (Golbe, 1998). La mutazione Ala30Pro determina un fenotipo che riproduce strettamente la malattia di Parkinson idiopatica sia in termini di età di esordio che di evoluzione (Clayton, 1998). La malattia derivante dalla duplicazione di *SNCA* è simile a quello della MP idiopatica con esordio tardivo e lenta progressione, mentre in caso di triplicazione il fenotipo si presenta tipicamente aggressivo e rapidamente evolutivo, suggerendo una correlazione tra il dosaggio genico e la progressione di malattia (Charter-Harlin, 2004; Ibanez, 2004).

Il prodotto del gene dell' α -sinucleina è costituito da una proteina identificata nel 1988 in una library di cDNA dell'organo elettrico della Torpedo. Nel 1993 si scoprì che la sinucleina rappresentava il

precursore di uno dei costituenti delle placche senili nella malattia di Alzheimer (Spillantini, 1997). L' α -sinucleina è una proteina di 140 aminoacidi e rappresenta il maggiore componente dei corpi di Lewy (Murray, 2001). Negli esseri umani sono note almeno tre forme di sinucleine, denominate α -, β - e γ - sinucleine, espresse da tre differenti geni (Murray, 2001). L' α -sinucleina è una proteina abbondantemente rappresentata nei terminali nervosi presinaptici del cervello dei mammiferi, in particolare a livello della corteccia, dell'ippocampo, dello striato, della substantia nigra, del tratto e del bulbo olfattorio e dell'ipotalamo. Si è dimostrato che l' α -sinucleina è in grado di legarsi con proteine e lipidi di membrana, ma il significato di tali interazioni ancora non è ben noto (Spira, 2001). Essendo la sua localizzazione perinucleare e presinaptica, si è ipotizzato un suo ruolo nella modulazione del turnover delle vescicole sinaptiche e della plasticità neuronale (Murray, 2001). Nei topi knockout per il gene dell' α -sinucleina è stato dimostrato un aumento del rilascio di dopamina in seguito ad opportuno stimolo ed una riduzione delle risposte motorie dopamino-dipendenti all'anfetamina, suggerendo un preminente ruolo della sinucleina come regolatore presinaptico negativo della neurotrasmissione dopaminergica (Abelevich, 2000).

In una variante di topi transgenici, esprimenti sia la variante wild-type che la variante mutata di α -sinucleina, si è provato che la mutazione

Ala53Thr ed Glu46Lys, localizzate in una regione della proteina costituita da α -elica circondata da β -sheets, determinano un incremento ed un'estensione delle strutture β -plated sheets. Queste ultime sarebbero responsabili dell'abnorme accumulo di autoaggregati insolubili fibrillari dell' α -sinucleina, non più suscettibili del processo di proteolisi normalmente operato dai proteosomi. L'effetto tossico delle protofibrille sarebbe da attribuire alla loro capacità di aumentare la permeabilità di membrana attraverso la formazione di strutture simili a tubuli ed a pori (Lashuel 2002). Inoltre, la mutazione Ala53Thr favorirebbe la depolarizzazione mitocondriale e l'attivazione dell'apoptosi, alterando il potenziale di membrana mitocondriale (Giasson, 2000; Muslih, 2000; Matsuoka, 2001; van der Putten, 2000; Hasegawa, 2006). La mutazione puntiforme Ala30Pro sembrerebbe interferire con la funzione della regione N-terminale dell' α -sinucleina, impedendone la normale interazione con le vescicole sinaptiche ed inducendone probabilmente l'autoaggregazione (Clayton, 2000). Le duplicazioni e triplicazioni di *SNCA* determinerebbero un'eccessiva espressione dell' α -sinucleina, conducendo ad un incremento nella formazione di protofibrille.

PARK8

Il locus PARK8 contiene approssimativamente 116 geni ed è stato mappato per la prima volta con analisi di linkage sul cromosoma

12p11.21-q13.1 in una grande famiglia giapponese con parkinsonismo autosomico dominante ed assenza di corpi di Lewy (Funayama, 2002). Nel 2004 in estese famiglie di origine basca, tedesca e nord-americana, sono state identificate delle mutazioni puntiformi del gene *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2) (Paisan Ruiz, 2004, Zimprich, 2004). *LRRK2* è costituito da 51 esoni e fino ad oggi sono state identificate venti mutazioni, ma la patogenicità è stata confermata attraverso analisi di segregazione solo per sei di queste: I1122V, R1441C, R1441G, Y1699C, G2019S, e I2020T (Mata, 2006). Le mutazioni più comuni sono la R1444G, che è responsabile di circa il 3% delle forme sporadiche e dell'8% delle forme familiari nelle popolazioni del nord della Spagna (Mata, 2005), e la G2019S, localizzata nell'esone 41 e riscontrata nel 5-6% circa delle forme familiari e nel 1-2% delle forme sporadiche (Di Fonzo, 2005; Gilks, 2005; Skipper, 2005).

Diversi recenti studi hanno mostrato che l'etnicità gioca un ruolo significativo nella frequenza della mutazione G2019. La prevalenza della mutazione risulta eccezionalmente alta in Nord Africa (Algeria, Marocco, Tunisia) dove è responsabile del 40% delle forme familiari e sporadiche (Lesage, 2006), e tra gli Ebrei Ashkenazi dove determina il 30% delle forme familiari e il 13% delle forme sporadiche (Ozelius, 2006). Inoltre, i portatori di questa mutazione in centro e nord Europa, nord America e nord Africa condividono un comune aplotipo,

suggerendo un effetto fondatore ancestrale che risalirebbe al quattordicesimo secolo d.C. (Lesage, 2005; Kaghergus, 2005).

La mutazione G2019S non è stata invece riportata in tre studi indipendenti che hanno visto coinvolti più di duemila soggetti asiatici, tra cinesi, indiani e malesi (Tan 2005d, Fung, 2006). Tuttavia nella popolazione asiatica il polimorfismo G2385R nel promotore del gene costituisce fattore di rischio per lo sviluppo della MP (Di Fonzo, 2006, Tan, 2007b). Anche screening effettuati su numerosi campioni greci, polacchi ed australiani hanno dato risultati negativi (Bialecka, 2005; Xiromeisou, 2007).

La penetranza delle mutazioni del gene *LRRK2* è estremamente variabile. Zimprich et al. hanno dimostrato che la penetranza associata alla mutazione G2019S è altamente età dipendente variando dal 17% a 50 anni all'85% a 70 anni.

Al momento sono disponibili pochi dati autoptici, ma sembra che le mutazioni nel gene *LRRK2* diano origine a diversi e diffusi aspetti neuropatologici. La mutazione R1444C, ad esempio, era associata in una famiglia caucasica ad alfa-sinucleinopatia, tauopatia e degenerazione striatonigrale classica e degenerazione dei motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale (Zimprich, 2004). I reperti autoptici di 2 soggetti britannici con MP e mutazione G2019S hanno

mostrato diffusione dei corpi di Lewy nella corteccia limbica, inclusioni neuronali e gliali tau-positive (Gilks, 2005).

Il gene *LRRK2* è costituito da 51 esoni e codifica per una proteina di 2527 aminoacidi, denominata dardarina (dal termine basco *dardara* che significa tremore), che appartiene alla famiglia delle proteine Ras/GTPasi, chiamate ROCO. Questa proteina agisce probabilmente sia come chinasi che come GTPasi. Il gene *LRRK2* ha 5 domini altamente conservati: un dominio Roc (Ras in proteine complesse); un dominio Cor (regione C-terminale di Roc); 12 sequenze ripetute in tandem ricche di leucina, della lunghezza di 22-28 aminoacidi; un dominio catalitico tirosina-chinasi; un dominio WD40, coinvolto nell'assemblaggio del citoscheletro e nella trasduzione del segnale (figura 2). Le funzioni di dardarina sarebbero molteplici, ed in particolare la proteina sarebbe coinvolta nella trasduzione del segnale intracellulare, riorganizzazione del citoscheletro, traffico vescicolare, trasporto nucleo- citoplasmatico, fosforilazione di tau ed α -sinucleina. La proteina ha una localizzazione citoplasmatica, è presente in tutto il SNC con prevalenza nel putamen e sostanza nera, ma è stata riscontrata con tecniche di Northern blot a livelli più bassi in polmone, cuore e fegato (Zimprick, 2004).

Le mutazioni G2019S e I2020T cadono nel segmento di attivazione del dominio chinasi, determinando verosimilmente un incremento dell'attività chinasi con conseguente iperfosforilazione di substrati

come le proteine tau ed α -sinucleina. Le mutazioni R1444C e R1444G sono localizzate nel dominio GTPasi, e probabilmente determinano un cambiamento della struttura di superficie della proteina che è implicata nell'interazione con altri peptidi.

PARK8 è caratterizzato da un fenotipo e da un decorso clinico della MP sporadica con età di esordio compresa tra 35 ed i 78 anni, e con buona risposta alla l-dopa. Tuttavia, sono stati descritti 2 casi di demenza e 2 di amiotrofia (Zimprich, 2004), ed un solo caso con distonia all'esordio (Gilks, 2005). Non sono segnalati significativi disturbi cognitivi (MMSE >24/30) ma sono stati riportati disturbi comportamentali: attacchi d'ansia, depressione e psicosi, riportati nell'87% dei casi in un grosso campione italiano (Khan, 2005; Goldwurm, 2006). Gli studi PET con fluoro-dopa e SPECT per lo studio del trasportatore della dopamina (DAT), utilizzate per la valutazione dell'integrità dei terminali nervosi presinaptici del circuito nigrostriatale, hanno dato in pazienti con PARK8 reperti sovrapponibili a quelli riscontrati nella MP idiopatica, consistenti in riduzione della captazione del tracciante con un pattern asimmetrico e con maggiore coinvolgimento del putamen rispetto al caudato (Khan, 2005).

PARK2

Tra le forme monogeniche finora note, PARK2 è il più comune parkinsonismo ad esordio precoce. Il locus genetico è stato mappato sul

cromosoma 6q in famiglie consanguinee giapponesi (Matsumine et al 1997) e successivamente sono state individuate delezioni in grosso gene chiamato *parkina* (Kitada, 1998). La malattia ha una trasmissione autosomica recessiva ed è responsabile del 50% dei casi familiari e del 15% dei casi sporadici con esordio \leq ai 45 anni (Lucking, 2000). In PARK2 i reperti autoptici consistono nella perdita neuronale e gliosi con assenza dei corpi di Lewy nella pars compacta della substantia nigra e nel locus coeruleus.

Pazienti affetti da PARK2 presentano lenta progressione di malattia, con eccellente risposta alla l-dopa, ma con precoce comparsa di fluttuazioni motorie e discinesie da farmaco. Le distonie focali e simmetria dei segni sono comuni e spesso rappresentano sintomi di esordio. In confronto con la MP sporadica i reperti clinici sono più simmetrici. Il reperto di iperreflessia osteotendinea si riscontra nel 33-44% dei pazienti. (Lucking, 2000). Spesso si osserva uno sleep benefit, cioè un miglioramento delle prestazioni motorie nelle prime ore del mattino, dopo il riposo notturno. Il deterioramento cognitivo è solitamente raro, ma questi pazienti possono sviluppare disturbi psichiatrici, quali ansia, depressione, psicosi, disturbo ossessivo-compulsivo. La funzione olfattoria, che è precocemente alterata nella MP idiopatica, è preservata in quella indotta da mutazioni del gene parkin (Sveinbjornsdottir, 2000). Le indagini di imaging funzionale

quali PET con fluorodopa e SPECT con studio del trasportatore della dopamina, evidenziano reperti di disfunzione dopaminergica nigrostriatale presinaptica simili a quelli osservati nella MP idiopatica, anche se con pattern meno asimmetrici (Zhang, 2000 ; Valente, 2001).

Il gene *parkin* ha una dimensione di 500 Kb ed è costituito da 12 esoni. Nella regione N-terminale del gene è presente un dominio ubiquitin-like, mentre la porzione C-terminale contiene due domini Ring-finger con funzione ubiquitina-ligasi (figura 3). Al momento sono note più di cento mutazioni tra delezioni, duplicazioni o moltiplicazioni, mutazioni missense o di troncamento. L'espressione e la funzione del prodotto genico, e dunque l'espressione fenotipica potrebbero essere influenzati da fattori ambientali o genetici, come elementi regolatori all'interno delle lunghe regioni introniche del gene o geni modificanti non ancora noti. Un comune polimorfismo nel promotore, che influenza la trascrizione sotto condizioni di stress ossidativi, è stato associato con MP ad esordio tardivo (Tan, 2005b).

Il prodotto genico è una proteina di 465 aminoacidi, diffusamente espressa nei neuroni pigmentati della substantia nigra e del locus coeruleus, del putamen e della corteccia frontale. La sua localizzazione è citoplasmatica, ma potrebbe colocalizzarsi anche nell'apparato di Golgi, reticolo endoplasmatico, nelle vescicole sinaptiche e sulla membrana mitocondriale esterna (Kubo, 2001; Shimura, 1999; Darios,

2003). La proteina parkina è insieme all'ubiquitina ed all' α -sinucleina un costituente dei corpi di Lewy. La funzione di questa proteina è quella di una E3-ubiquitina-ligasi, cioè di stabilire un legame covalente tra l'ubiquitina e substrati destinati alla degradazione da parte del sistema ubiquitina-proteasoma (figura 4). Mutazioni nel gene parkin causano la perdita di funzione della proteina, portando all'accumulo di proteine non-ubiquitinate. Tale disfunzione potrebbe accelerare la perdita neuronale, in particolare delle cellule dopaminergiche, rese più suscettibili dalla continua esposizione agli ossiradicali prodotti nel pathway di sintesi della dopamina. Inoltre, la disfunzione di parkina si assocerebbe a riduzione della fosforilazione ossidativa mitocondriale, della capacità mitocondriale respiratoria ed incremento del danno ossidativo età-dipendente (Greene, 2003; Pesah, 2004).

PARK6

PARK6 è una forma monogenica di MP ereditata con modalità autosomica recessiva determinata da mutazioni del gene *PINK1* (Phosphatase and Tensin-Induced Kinase 1). Il locus mappato sul cromosoma 1p35-36 fu per la prima volta individuato in una famiglia di origine siciliana (Valente, 2001). Il gene *PINK1* fu successivamente clonato studiando delle famiglie di origine spagnola ed italiana nelle

quali furono identificate la mutazione missense G309D e di troncamento W437X (Valente, 2004). La mutazione W437X è stata riscontrata in un'altra famiglia italiana con MP ad esordio precoce, ma non in soggetti di differenti nazionalità, suggerendo l'esistenza di un probabile effetto fondatore in Italia (Bonifati, 2005; Khan, 2005). Successivamente sono state identificate altre mutazioni puntiformi, di frameshift e di troncamento (Ibanez, 2006; Bonifati, 2005; Tan, 2006). Le alterazioni di questo gene sono responsabili dell'1 al 7% circa di MP ad esordio precoce o MP autosomica recessiva nella popolazione caucasica (Valente, 2004; Rohè, 2005), dell'8.9% di MP autosomica recessiva in Giappone (Li, 2005) e del 2 al 3% di MP familiare e sporadica nella popolazione cinese (Tan, 2006c). Il fenotipo clinico è simile a quello di PARK2, presentandosi spesso con distonie all'esordio, iperreflessia osteotendinea e sleep benefit. Sono stati descritti anche disturbi psichiatrici.

Il prodotto del gene *PINK1* è una proteina di 581 aminoacidi, espressa ubiquitariamente nei mitocondri e contenente un dominio altamente conservato serina-treonina chinasi, nel quale sono localizzate la maggior parte delle mutazioni identificate. Si ipotizza che la funzione della proteina wild type sia quello di svolgere un ruolo neuroprotettivo, contro lo stress ossidativo e la disfunzione mitocondriale.

PAZIENTI E METODI

Tutti i pazienti sottoposti al nostro screening sono stati reclutati, previo consenso informato scritto, presso il nostro ambulatorio di disordini del movimento del Dipartimento di Scienze Neurologiche. Tutti i casi erano di origine caucasica e provenivano dal Sud Italia, e prevalentemente dalla regione Campania. La diagnosi di MP era stata formulata secondo i criteri stabiliti dalla UK Brain Bank (Daniel, 1993). Per ogni paziente è stato effettuato un esame neurologico completo e per la valutazione del parkinsonismo sono state applicate la Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) parte motoria III, e la Hoehn & Yahr scale (Fahn, 1987; Hoehn, Yahr, 1967).

Dopo aver effettuato prelievo di sangue venoso, il DNA genomico è stato estratto dai leucociti con tecniche standard (Maniatis et al, 1982). In tutti i casi gli esoni di interesse sono stati amplificati tramite tecniche di PCR.

PARK 1

Abbiamo valutato la mutazione Ala53Thr e moltiplicazioni nel gene dell' α -sinucleina in 46 pazienti, (19 M e 27 F). L'età media di esordio era 49.6 ± 12 anni (range 20-71). Quaranta soggetti riferivano parenti affetti in due o più generazioni consecutive, negli altri 6 casi erano

riportati fratelli e/o cugini con tremore o parkinsonismo. In tre casi c'era consanguineità. Due pazienti presentavano demenza.

La mutazione puntiforme A53T è stata ricercata tramite sequenziamento diretto con sequenziatore automatico, mentre duplicazioni o triplicazioni del gene sono state escluse tramite tecniche di dosaggio genico con real-time PCR semiquantitativa.

PARK8

La mutazione G2019S nel gene *LRRK2* è stata cercata in 129 pazienti (56 F e 73 M). In 41 casi era riportato almeno un parente di primo grado affetto in due o più generazioni consecutive, 15 riferivano fratelli o cugini affetti, i restanti 73 soggetti negavano familiarità per MP e sono stati considerati sporadici. In 9 casi, inoltre, c'era consanguineità tra i genitori. Al momento dello screening, l'età media \pm SD era di 62 ± 12.1 anni (range 36-83) e l'età di esordio era 50.2 ± 12 (20-78). In due casi era presente demenza.

L'amplificazione dell'esone 41 è stata effettuata con PCR usando i seguenti primer: F 5¹ TTTTGATGCTTGACATAGTGGAC3¹; R5¹ CACATCTGAGGTCAGTGGTTATC3¹.

I prodotti di PCR sono stati sottoposti a trattamento di purificazione tramite centrifugazione e poi a digestione enzimatica con endonucleasi di restrizione SfcI.

Park2

Lo screening per PARK2 è stato praticato in 46 pazienti di origine campana (30 maschi e 16 femmine). L'età media di esordio \pm DS era 39.6 ± 9.4 anni (range 18-59). Cinque soggetti avevano un fratello affetto ed in 9 casi era riportata consanguineità tra i genitori.

In 11 pazienti la ricerca di mutazioni è stata effettuata utilizzando l'analisi dei polimorfismi conformazionali dei singoli filamenti (SSCP). Negli altri 29 casi, il DNA genomico è stato sottoposto ad uno screening per riarrangiamenti esonici del gene parkin tramite l'uso di PCR semiquantitativa. Nei campioni nei quali tale tecnica non evidenziava nessuna o una mutazione su un solo allele, l'intera regione codificante è stata analizzata per sequenziamento diretto (Lohmann, 2003).

PARK6

Abbiamo valutato la presenza di mutazioni del gene *PINK1* in una coorte di 58 pazienti (40 maschi e 18 femmine) con MP ad esordio precoce. In tutti i casi la sintomatologia extrapiramidale si era manifestata prima dei 50 anni. L'età media di esordio \pm DS era 41.3 ± 7.8 anni (range 20–49 anni). Trentaquattro pazienti negavano familiarità per MP e furono considerati sporadici, mentre in 15 casi era riportato almeno un parente affetto di primo grado (un genitore in 9 ed

uno o più fratelli in 6). Consanguineità tra i genitori era riportata in 7 casi.

Dopo aver amplificato la regione genica codificante il gene PINK1 tramite PCR, la ricerca di mutazioni veniva eseguita con sequenziamento diretto.

RISULTATI

PARK1

Nel gruppo dei pazienti studiati per PARK1 non è stato trovato nessun caso di mutazione Ala53Thr o di moltiplicazioni del gene dell' α -sinucleina.

PARK8

La mutazione G2019S non è stata riscontrata nel gruppo dei pazienti con familiarità autosomica dominante né in quello dei soggetti che riportavano una familiarità con trasmissione apparentemente recessiva. Nel gruppo dei soggetti con MP sporadica è stato riscontrato un solo caso di mutazione, confermata con sequenziamento diretto. Il paziente aveva avuto un esordio di malattia all'età di 48 anni con tremore a riposo agli arti di destra e depressione del tono dell'umore. Al momento dello screening aveva 57 anni e presentava ancora un'ottima risposta alla l-dopa ed ai dopamino-agonisti. Nel corso degli anni, tuttavia, il quadro clinico si era complicato con fluttuazioni motorie (fenomeni on-off) e discinesie da farmaco. In fase "on" lo score UPDRS-III era 18/108 ed il punteggio HY 2. Il paziente aveva una personalità di tipo ossessivo con disturbo d'ansia. Durante la terapia

con dopamino-agonisti, aveva presentato delirio di gelosia e fenomeni dispercettivi.

Il paziente negava familiarità per MP, furono tuttavia valutati neurologicamente i genitori ed una delle due sorelle minori (figura 5), mentre l'ultimogenita rifiutava di sottoporsi alla visita. L'esame neurologico del padre e della sorella non evidenziarono segni di parkinsonismo, mentre la madre dell'età di 80 anni presentava tremore a riposo all'arto superiore dx, ipertono plastico sia assiale ed appendicolare più evidente a destra, bradicinesia e rallentamento nella deambulazione. I disturbi motori della paziente erano insorti da circa due anni ed erano stati considerati di natura ortopedica ed attribuiti a malattia artrosica generalizzata.

Previo consenso informato, l'analisi molecolare fu estesa alla famiglia del nostro probando. La mutazione G219S fu esclusa nel padre e nella sorella, ma fu riscontrata nella madre.

Il probando veniva sottoposto a valutazione neuropsicologica completa da cui risultava un punteggio al Mini Mental State Examination di 26/30, una compromissione delle funzioni frontali, della memoria logica ed a lungo termine verbale.

La RM encefalo risultava nei limiti della norma.

PARK2

Nell'ambito dei 46 pazienti studiati, 6 pazienti (5 maschi ed 1 femmina) risultavano avere delezioni su entrambi gli alleli del gene parkin, mentre 3 pazienti, 1 di sesso maschile e 2 di sesso femminile, risultavano portatori di una singola mutazione o delezione in eterozigosi. (Tabella1).

Nel paziente 1 l'esordio dei sintomi si era verificato all'età di 18 anni con distonia all'arto superiore sinistro. Dopo nove anni di malattia presentava ancora un'ottima risposta alla l-dopa, ma con precoce comparsa di discinesie e fluttuazioni motorie che avevano condotto ad un trattamento con apomorfina ad infusione continua sottocutanea. Il punteggio in fase "on" alle scale UPDRS-III e HY rispettivamente era di 40/108 e 3. La RM encefalo risultava nei limiti della norma

Il paziente 2 aveva avuto esordio all'età di 33 anni con distonia del collo. Il punteggio dell'UPDRS-III in fase on era 34/108 e dell'HY 2 e l'esame neurologico evidenziava iperreflessia osteotendinea. Al momento dello screening era ancora in trattamento con dopamino-agonisti e non aveva sviluppato fluttuazioni motorie né discinesie. La RM dell'encefalo mostrava iperintensità nelle sequenze T2 nella sostanza bianca periventricolare.

La MP si era manifestata nel paziente 3 all'età di 47 anni con tremore a riposo alla mano destra. Il punteggio dell'UPDRS-III in fase on era

37/108 e dell'HY 3. L'esame neurologico evidenziava iperreflessia osteotendinea ed un'andatura lievemente spastica. Anche in questo paziente l'ottima risposta alla l-dopa era complicata da discinesie. La RM dell'encefalo mostrava una atrofia corticale diffusa con segnale iperintenso dei fasci corticospinali nelle sequenze T2.

Nel paziente 4 l'esordio era stato con tremore a riposo alla mano destra all'età di 20 anni. Al momento dello screening la fase di malattia secondo la scala HY era 1 ed il punteggio UPDRS-III era 18/108. Anche in questo caso i riflessi osteotendinei risultavano vivaci.

La paziente 5 aveva avuto un esordio di malattia all'età di 28 anni con distonia all'arto inferiore sinistro. L'esame neurologico, oltre ad una sindrome extrapiramidale prevalente agli arti di sinistra, mostrava un'atassia della marcia. Il punteggio UPDRS-III era 16/108 e la fase HY era 1. La RM del cranio evidenziava anomalie di segnale nel cervelletto.

Il paziente 6 aveva avuto un esordio all'età di 18 anni con bradicinesia e rigidità, e con una sindrome atasso-spastica. Al momento dello screening, il punteggio UPDRS-III era 36/108 e la fase HY era 2.5. La RM del cranio mostrava un'area di aumentato segnale nella sostanza bianca frontale sinistra.

Il paziente 7 aveva iniziato a lamentare i primi disturbi dall'età di 35 anni, caratterizzati da crampi e tremore a riposo agli arti di sinistra. La

RM del cranio risultava nella norma. La fase di malattia secondo la scala HY era 1.5 ed il punteggio UPDRS-III era 16/108

Nella paziente 8 l'esordio dei sintomi si era verificato all'età di 43 anni con tremore ed impaccio motorio alla mano destra. Presentava una buona risposta ai dopamino-agonisti. Al momento dello screening la fase di malattia secondo la scala HY era 1.5 ed il punteggio UPDRS-III era 20/108. La RM dell'encefalo mostrava dei nuclei iperintensi nella sostanza bianca periventricolare.

La paziente 9 aveva iniziato a lamentare dall'età di 40 anni i primi disturbi consistenti in distonia e tremore alla mano sinistra. La risposta alla l-dopa fu fin dall'inizio brillante, ma precocemente la paziente sviluppò discinesie generalizzate e fluttuazioni motorie. La fase di malattia secondo la scala HY era 1.5 ed il punteggio UPDRS-III era 10/108 in fase "on". La RM dell'encefalo risultava normale.

PARK6

Dei 58 probandi, una paziente risultò portatrice in omozigosi della sostituzione G1311A nell'esone 7 risultante nella mutazione nonsense W437X. La madre ed altri parenti nella linea materna erano affetti da MP (figura 6). Entrambi i genitori furono valutati neurologicamente ed analizzati geneticamente per la stessa mutazione. La mutazione W437X fu riscontrata in eterozigosi in entrambi, ma non fu trovata nessuna altra mutazione o riarrangiamento genico dell'altro allele.

Entrambi i genitori originavano di un piccolo paese del sud Italia, ma veniva negato un rapporto di consanguineità. La probanda era una donna di 51 anni nella quale la MP era esordita con tremore all'arto inferiore sinistro e bradicinesia all'età di 22 anni. La risposta alla l-dopa era stata ottima fin dall'inizio, ma dopo due anni di trattamento si era verificata la comparsa di discinesie dolorose alle gambe e fluttuazioni motorie che avevano spinto la paziente ad una automedicazione compulsiva (fino a 2 gr al giorno di l-dopa). Nello stesso periodo la paziente presentava una depressione del tono dell'umore ed un disturbo di personalità istrionico e paranoideo. La terapia con l-dopa fu ridotta a 100mg/die e fu aggiunta apomorfina alla dose di 1 mg s.c. x dieci volte al dì. Al momento dell'analisi molecolare lo score dell'UPDRS-III era 8/108 in fase on e 44/108 in fase off. L'esame neurologico mostrava dei riflessi osteotendinei vivaci, oltre ad una sindrome extrapiramidale

caratterizzata da ipomimia, rigidità assiale, bradicinesia e tremore d'azione e posturale agli arti superiori. La RM dell'encefalo mostrava una lieve atrofia sopra ed infratentoriale.

La madre della probanda aveva 73 anni e dall'età di 53 anni aveva cominciato a lamentare rallentamento motorio e tremore a riposo al braccio sinistro. Anche lei presentava buona risposta alla l-dopa, con la comparsa, tuttavia, di discinesie di picco, fluttuazioni motorie e distonia del mattino. Il punteggio UPDRS-III in fase off era 42/108 e la fase di malattia secondo la scale HY era 3. Non presentava compromissione delle funzioni cognitive ma lamentava urgenza urinaria.

DISCUSSIONE

Sebbene per un lungo periodo la MP sia stata considerata un disordine sporadico, negli ultimi anni l'attenzione è stata particolarmente rivolta ad un possibile ruolo svolto da fattori genetici nella patogenesi della malattia. Questa ipotesi è stata supportata da diversi studi che hanno evidenziato che pazienti con MP tendevano a riportare una storia familiare positiva (Lazzaroni, 1994), e che i parenti di primo grado di affetti avevano un rischio doppio rispetto alla popolazione di sviluppare la malattia (Marder, 1996). Al momento sono note solo 8 forme monogeniche di MP ereditate con modalità di tipo mendeliano, quattro autosomiche recessive e quattro autosomiche dominanti. In tutte queste forme diverse linee di evidenza suggeriscono che i meccanismi patogenetici coinvolgono lo stress ossidativo, la disfunzione mitocondriale, il malfunzionamento del sistema ubiquitina-proteasoma e l'aggregazione proteica.

Nel corso del nostro dottorato la mia attenzione è stata rivolta in particolare allo studio clinico e genetico di due forme di MP autosomiche dominanti (PARK1 e PARK8) e due autosomiche recessive (PARK2 e PARK6).

Park1 è una forma parkinsonismo familiare derivante da mutazioni del gene dell' α -sinucleina trasmesso con modalità autosomica

dominante e con una penetranza di circa l'85%. La prima mutazione identificata fu Ala53Thr, responsabile di una malattia ad esordio precoce, con rapida evoluzione, demenza, mioclono ed ipoventilazione. Successivamente furono trovate le mutazioni Ala30Pro ed E46K in una famiglia tedesca e spagnola rispettivamente. Nella famiglia spagnola il fenotipo della malattia ricordava quello della demenza a corpi di Lewy. Recentemente sono state individuate moltiplicazioni del gene dell' α -sinucleina, responsabile di MP familiare. Polimorfismi nel promotore, inoltre, sono stati associati a maggior rischio di sviluppare MP idiopatica (Pals, 2004; Tan, 2004). Noi abbiamo cercato mutazioni e moltiplicazioni del gene della α -sinucleina in 46 pazienti afferenti al Dipartimento di Scienze Neurologiche, con familiarità per MP. In tre casi era riportata consanguineità tra i genitori ed due soggetti presentavano demenza. In nessun caso sono state identificate anomalie del gene dell' α -sinucleina. I nostri risultati sono in accordo con quelli di studi precedenti che indicavano PARK1 come causa rara di MP familiare.

Chan et al. hanno analizzato una coorte di 1000 soggetti con MP ad esordio precoce senza trovare la mutazione Ala53Thr in nessun caso (Chan, 1998). Farrer ha cercato la stessa mutazione in sei famiglie di diversa origine (statunitense, irlandese, olandese, portoricana, russa, afro-americana) i cui probandi avevano un'età di esordio compresa tra i

30 ed i 65 anni, presentavano una buona risposta alla l-dopa, e solo in alcuni casi demenza. Nessun caso risultò positivo allo screening (Farrer, 1997). Johnson ha analizzato 101 soggetti con MP familiare, 325 casi sporadici, 65 casi di demenza a corpi di Lewy e 366 controlli, senza trovare nessun portatore di duplicazione o triplicazione, suggerendo che anche le moltiplicazioni del gene sono molto rare (Johnson, 2004).

PARK8 è una forma di MP monogenica determinata da mutazioni nel gene *LRRK2*, mappato sul cromosoma 12 e codificante per una proteina citoplasmatica con attività tirosino-chinasica, denominata *dardarina*. La malattia è caratterizzata da penetranza bassa ed età-correlata, l'esordio si manifesta in genere con tremore e può essere compreso tra i 30 ed i 70 anni. Presenta un quadro clinico ed un decorso tipici della MP idiopatica, con buona risposta alla l-dopa. Sono state descritte, tuttavia, varianti fenotipiche e patologiche (Zimprich, 2004). Fino ad oggi sono note 20 mutazioni del gene *LRRK2*, di cui solo sei sono sicuramente patogenetiche. La mutazione G2019S, localizzata nell'esone 41 del dominio chinasi, è la più frequente nella popolazione caucasica, essendo responsabile dal 2 all'8% delle forme familiari autosomiche dominanti, e dall'1 al 2% delle forme sporadiche (Di Fonzo, 2005; Gilks, 2005; Skipper, 2005). Abbiamo cercato la mutazione G2019S in un campione di 129 soggetti di origine campana, di cui 56 riferivano familiarità per MP. Un solo paziente, incluso nel gruppo con MP

sporadica, risultava portatore della mutazione. Il nostro probando aveva avuto un esordio di malattia all'età di 48 anni con tremore a riposo alla mano destra ed aveva fin dall'inizio presentato un'ottima risposta alla l-dopa. Come in precedenti studi su campioni di casi affetti da PARK8 (Khan, 2005), una valutazione neuropsicologica completa aveva evidenziato una compromissione delle funzioni esecutive con conservazione delle altre funzioni cognitive. Il paziente nel corso della sua storia aveva presentato comportamenti ossessivi, ansietà, depressione ed aveva sviluppato delirio di gelosia in seguito a trattamento con dopamino-agonisti. Il paziente opportunamente interrogato, negava la ricorrenza di problematiche neurologiche simili alle sue nell'ambito familiare. Tuttavia, una valutazione neurologica accurata dei genitori e della sorella minore del probando, permise di evidenziare evidenti segni di parkinsonismo nella madre. La donna al momento della visita aveva 80 anni e da due anni presentava tremore alla mano destra, una postura leggermente flessa del tronco, un rallentamento motorio e problemi di deambulazione. I suoi disturbi erano considerati di natura ortopedica ed attribuiti a problematiche geriatriche. L'analisi genetica dimostrò anche in lei la mutazione G2019S. Il nostro paziente, pertanto, non è da considerarsi come un caso sporadico, ma deve essere incluso nel gruppo dei pazienti con trasmissione di tipo autosomica dominante. E' probabile che numerosi

casi di MP geneticamente determinata possano essere etichettati come “apparentemente” sporadici e sfuggire ad una classificazione molecolare, se non sempre vengono attuati una dettagliata anamnesi, un attento esame del pedigree ed una mirata valutazione neurologica dei familiari. La penetranza incompleta ed età correlata di questa forma di parkinsonismo genetico e la mancanza di caratteristiche cliniche atipiche che potrebbero differenziarla dalla MP idiopatica, potrebbero indurre in inganno. Tuttavia, la semplicità ed economicità del test genetico per la mutazione G2019S giustificano l’indicazione all’analisi molecolare di questa specifica mutazione anche nei pazienti con MP idiopatica in assenza di storia familiare positiva.

Una volta riclassificato come autosomico dominante il nostro paziente, nel nostro campione con MP familiare la frequenza di mutazione era dell’1.8% circa, mentre nessun caso era identificabile nel gruppo dei pazienti con malattia sporadica. Quest’ultimo risultato potrebbe essere dovuto all’esiguità del campione esaminato. Infatti la frequenza di mutazione nella popolazione di origine europea nella MP sporadica è stata stimata tra lo 0.5 ed il 2% (Farrer, 2005; Di Fonzo, 2005; Gilks, 2005; Kachergus, 2005; Nichols, 2005) ed un ampio recente studio su 1072 pazienti di origine italiana ha stimato una frequenza della mutazione G2019S in Italia dell’1.3% nei casi sporadici e del 4.3% in quelli familiari (Marongiu, 2006). Tuttavia, studi molto

recenti hanno dimostrato che prevalenza di G2019S più bassa di quella precedentemente riportata. In un recente screening effettuato su 98 soggetti originari del Centro Italia, un solo paziente nel gruppo degli sporadici (88 soggetti) era portatore delle mutazione (frequenza dell'1.2%) (Squillaro, 2007). Un altro screening condotto in Sardegna in 98 soggetti con MP ha evidenziato un solo caso positivo per la mutazione G2019S, con una frequenza di mutazione di circa lo 0.9% (Cossu, 2007). Si potrebbe ipotizzare che la mutazione G2019S non sia una causa così frequente di MP in Italia ed in particolare nelle regioni meridionali, come è già stato dimostrato per altre nazioni del centro e nord Europa e del nord America. Anche in altre popolazioni screening effettuati per misurare la frequenza di mutazione hanno dato esito negativo. Uno studio condotto su un gruppo di 174 pazienti polacchi, di cui 21 con familiarità per MP, non mostrava mutazioni dell'esone 41 in nessun caso (Bialecka, 2005). Lo stesso risultato fu ottenuto in screening effettuati in gruppi di pazienti australiani ed in numerosi studi che hanno visto coinvolte alcune migliaia di asiatici, tra malesi, cinesi ed indiani (Tan, 2005d). Inoltre, G20129S è rara nel Nord della Spagna, dove prevale la mutazione R1441G, ed in Grecia, dove un recente studio ha invece identificato due nuove mutazioni del gene LRRK2 (Xiromerisou, 2007). Si può ipotizzare che il succedersi di diverse dominazioni nel Sud Italia e la conseguente mescolanza etnica

verificatasi nel corso dei secoli abbiano potuto influenzare la conservazione e la diffusione intergenerazionale della mutazione G2019S, riducendo l'effetto fondatore. Dati più certi potrebbero essere forniti ampliando la nostra casistica e studiando altre mutazioni del gene LRRK2.

PARK2 è il più comune parkinsonismo autosomico recessivo finora noto. Il fenotipo clinico caratterizzato da un esordio precoce, buona risposta alla l-dopa ma con precoce comparsa di complicanze motorie sleep benefit, frequente distonia all'esordio, iperreflessia osteotendinea, talora neuropatia periferica, disautonomia, neuropatia periferica assonale e disturbi comportamentali. Al momento sono note più di 100 mutazioni del gene *parkin*, consistenti in mutazioni puntiformi, riarrangiamenti esonici, duplicazioni e delezioni. PARK2 è responsabile di circa il 50% dei casi familiari e di circa il 70% dei casi sporadici con età di esordio inferiore ai 20 anni (Lucking, 2000; Periquet, 2003; Mata, 2004). La frequenza è stimata nei casi ad esordio inferiore ai 45 anni dal 2 al 18% (Lucking, 2000; Periquet, 2003; Mata, 2004; Wu, 2005). Nell'ambito dei 46 soggetti studiati per mutazioni del gene *parkin*, 5 pazienti hanno mostrato delezioni su entrambi gli alleli, 1 paziente presentava una delezione su un allele ed una mutazione puntiforme sull'altro, in 2 casi sono state identificate mutazioni puntiformi in eterozigosi ed in uno una singola delezione. La frequenza di mutazione

in omozigosi nel nostro campione risulta di circa il 13%, in accordo coi dati forniti dalla letteratura. In tutti i casi si tratta di un parkinsonismo ad esordio precoce, essendo l'età di esordio compresa tra i 18 ed i 47 anni. I pazienti 1, 2, 5 e 9 avevano lamentato come disturbo iniziale distonia focale, assiale o appendicolare, mentre negli altri casi il sintomo d'esordio era rappresentato da tremore a riposo, rigidità e/o bradicinesia. Iperreflessia osteotendinea era presente nei pazienti 2, 3 e 4. I pazienti 3, 5 e 6 presentavano un'andatura spastica o atassica. Tutti avevano una costante e brillante risposta alla l-dopa. Il fenotipo clinico dei nostri casi è coerente con quello precedentemente descritto, visto che diversi studi hanno confermato la ricorrenza in PARK2 di disturbi cerebellari e disfunzione della via piramidale (Kuroda, 2001; van de Warrenburg, 2001). Due (pazienti 8 e 9) dei 46 pazienti erano portatori di una singola mutazione puntiforme, mentre in un caso è stata riscontrata una delezione (paziente 7). Casi di MP eterozigoti per mutazioni del gene *parkin* sono stati riportati anche da altri gruppi (Kahn, 2002; Lucking, 2000; Periquet, 2003; Mata, 2004). La patogenicità di una singola mutazione eterozigote di *parkin* è tuttora oggetto di dibattito. Una delle spiegazioni potrebbe essere quella secondo cui lo screening mutazionale non comprende l'analisi completa del promotore e delle regioni introniche, dove potrebbero essere presenti delle alterazioni. Elementi regolatori, infatti, delle sequenze

intrinche potrebbero influenzare l'espressione e la funzionalità del prodotto genico attraverso modalità che ancora ci sfuggono. Una seconda ipotesi è che singole mutazioni eterozigoti di *parkin* potrebbero essere fattori di per sé non sarebbero sufficienti a causare la malattia ma che necessiterebbero dell'intervento di altri geni modificanti per l'espressione fenotipica. Infine, singole mutazioni di *parkin* potrebbero rappresentare eventi casuali, presenti in alcuni pazienti ma senza significato patogenetico. L'ipotesi che la condizione di eterozigosi sia in grado di determinare la patologia è stata confutata da una serie di studi che hanno dimostrato la ricorrenza di mutazioni di *parkin* anche nei gruppi di controlli (Clark, 2006). D'altra parte le mutazioni in eterozigosi potrebbero essere in grado di aumentare il rischio di sviluppare malattia, in quanto i soggetti portatori di un solo allele funzionante potrebbero come conseguenza della ridotta espressione genica presentare un maggior rischio di malattia, che potrebbe poi svilupparsi per l'azione di altri fattori genetici e/o ambientali.

Le alterazioni del gene *PINK1* sono responsabili dell'1 al 7% circa di MP ad esordio precoce o MP autosomica recessiva nella popolazione caucasica (PARK6) (Valente, 2004; Rohè, 2005). Abbiamo cercato la mutazione W437X in 58 pazienti con MP ad esordio precoce, di cui 34 con familiarità. Un solo soggetto era portatore della mutazione W437X in omozigosi. La nostra paziente aveva avuto un'età di esordio più

precoce rispetto a quella precedentemente descritta (range 30-48 anni), in quanto aveva cominciato a lamentare i primi disturbi all'età di 22 anni. Inoltre la paziente aveva presentato severa psicosi, mentre disturbi psichiatrici non erano mai stati riscontrati negli altri casi di mutazione W437X. Come atteso, entrambi i genitori erano portatori della stessa mutazione in eterozigosi, ma la madre era sintomatica. Come per mutazioni di *parkin*, non è ancora ben chiaro se mutazioni eterozigoti di PINK1 siano patogenetiche o costituiscano solo un fattore di rischio. La possibilità di singole mutazioni eterozigoti di indurre malattia è supportata da recenti studi caso-controllo in cui erano state trovate più frequentemente nei soggetti con MP sporadica che nei controlli sani (1.2 vs 0.4%). Queste mutazioni potrebbero essere solo dei reperti incidentali, oppure potrebbero essere associate ad altre mutazioni di geni non ancora noti o di regioni regolatrici non trascritte. Un'altra ipotesi è che il difetto subclinico nigrostriatale negli eterozigoti costituirebbe un fattore di rischio, abbassando la soglia di malattia che si slatentizzerebbe in presenza di altri fattori genetici e/o ambientali.

FIGURE E TABELLE

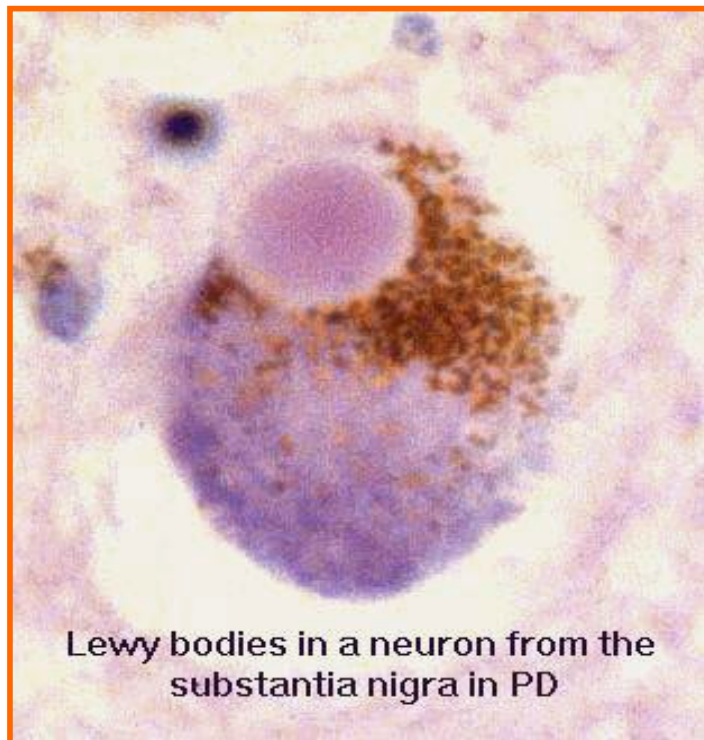


Figura 1: corpo di Lewy in un neurone della substantia nigra in un paziente con MP

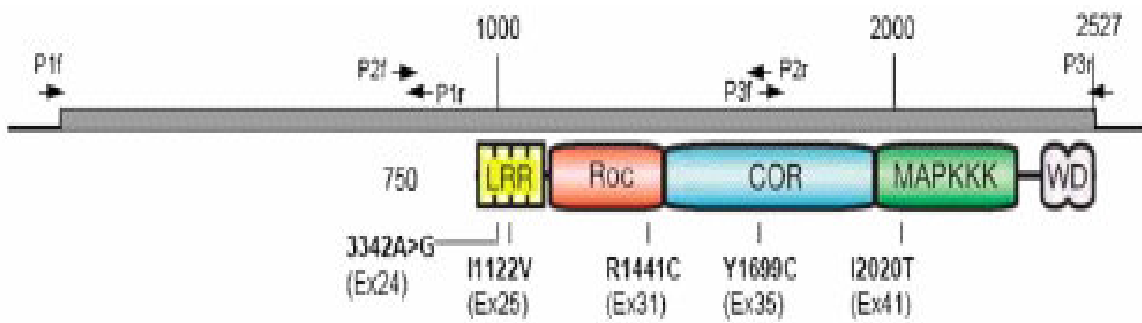


Figura 2: Struttura del gene LRRK2

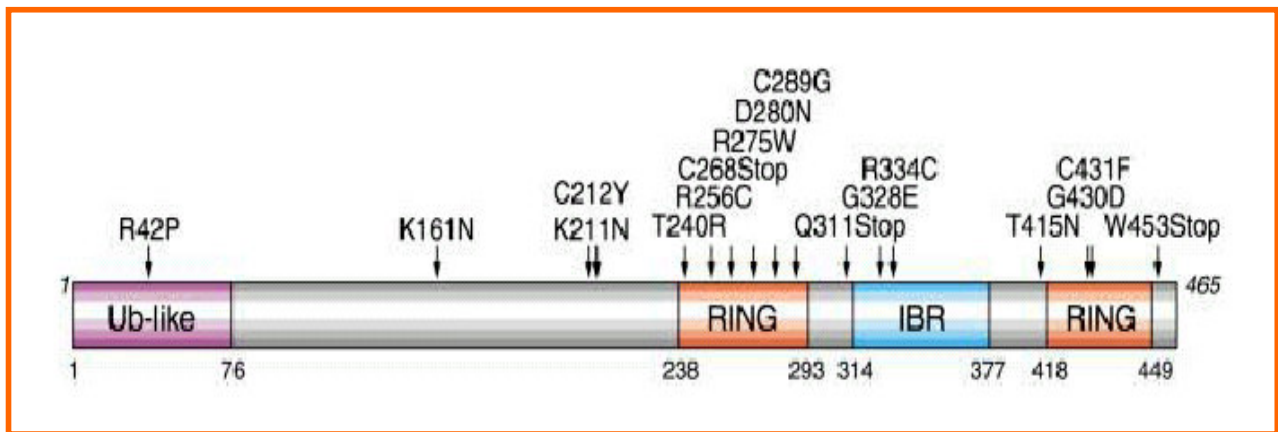


Figura 3: struttura del gene *parkin*

Sistema ubiquitina proteasoma

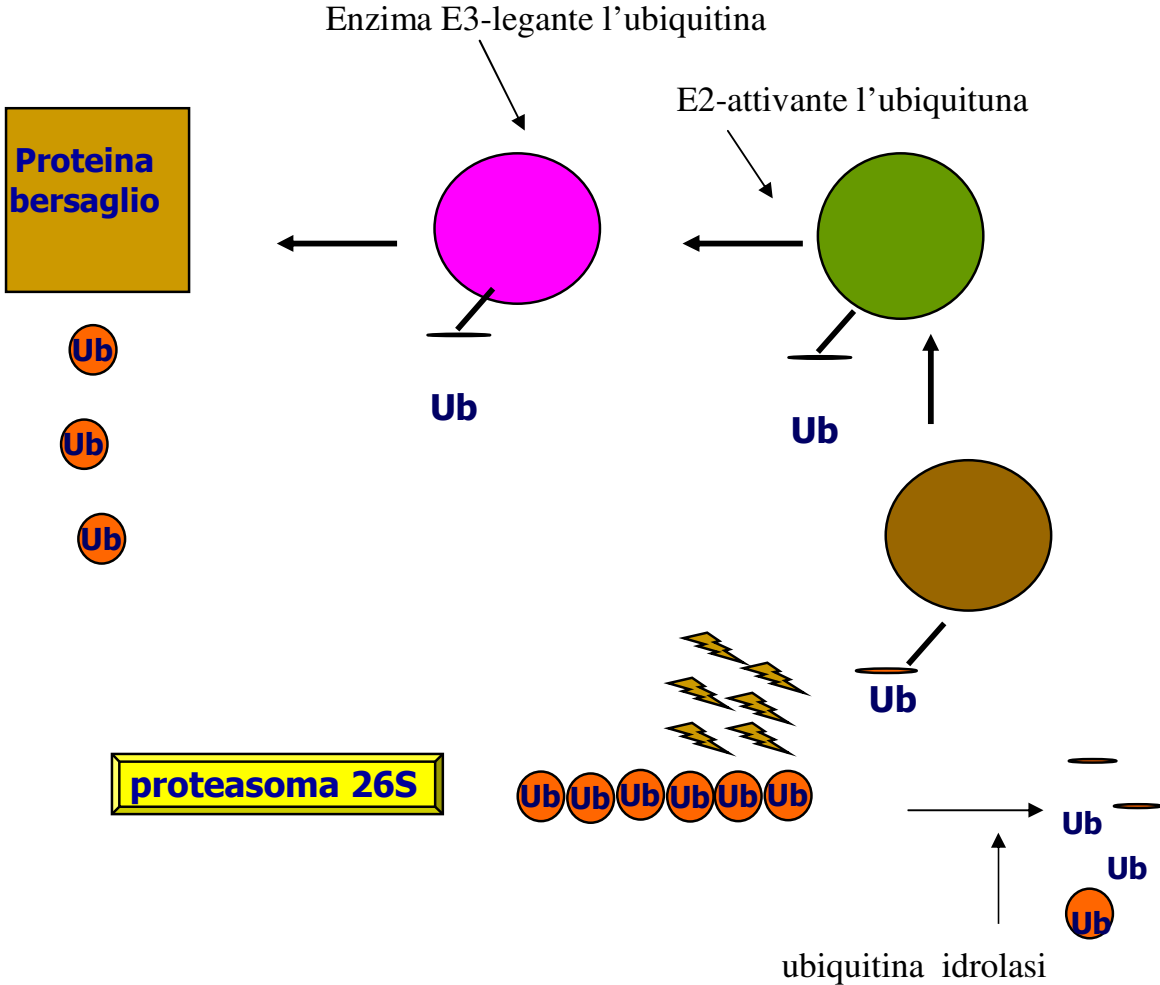


Figura 4: sistema ubiquitina-proteasoma

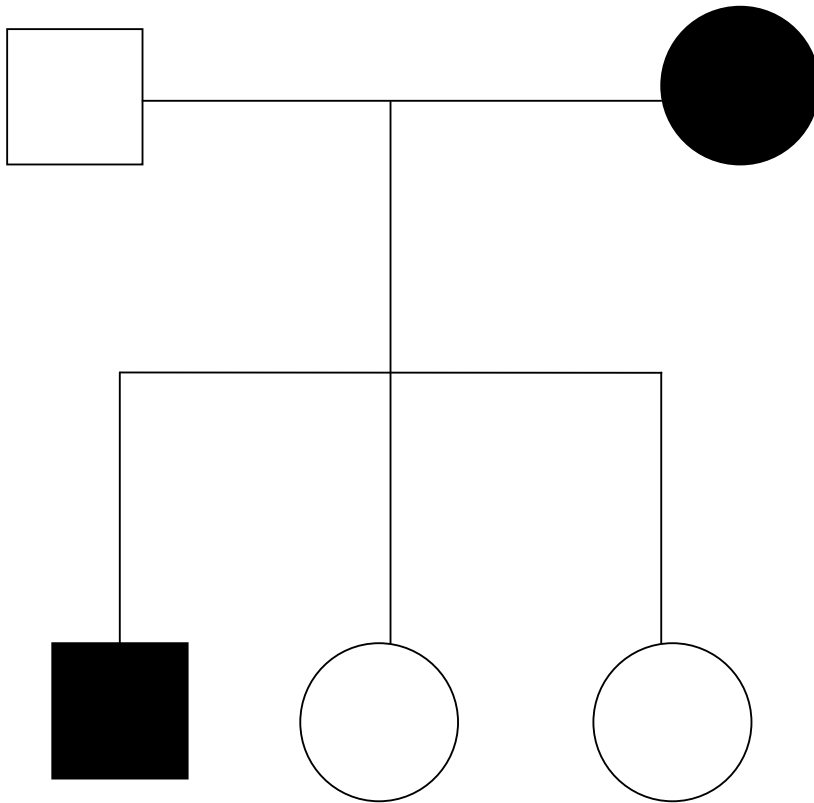


Figura 5. Albero genealogico della famiglia PARK8

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sesso	M	M	M	M	F	M	M	F	F
Età	27	33	57	41	43	28	43	44	49
Esordio	18	28	47	20	28	18	35	43	40
Distonia	braccio sx	collo	-	-	atassia	atassia	-	-	mano sx
Pir S	assenti	ROT +	andatura spastica, ROT+	ROT+	-	spasticità	-	-	-
UPDRS-III	40	34	30	18	16	36	16	20	10
H&Y	3	2	2	1	1	2.5	1.5	1.5	1.5
Mut	del3/del2-3	del2/del2-4	del3-4/del3-4	del3/del3	del3/del3	del2-4 Thr240Met	del3-4	C1305T	Ala401Asp

Pir s: segni piramidali; ROT +: iperreflessia osteotendinea; le scale UPDRS-III e Hohen&Yahr si riferiscono alla fase “on”; mut: mutazione

Tabella 1: aspetti clinici dei pazienti con mutazioni del gene *parkin*

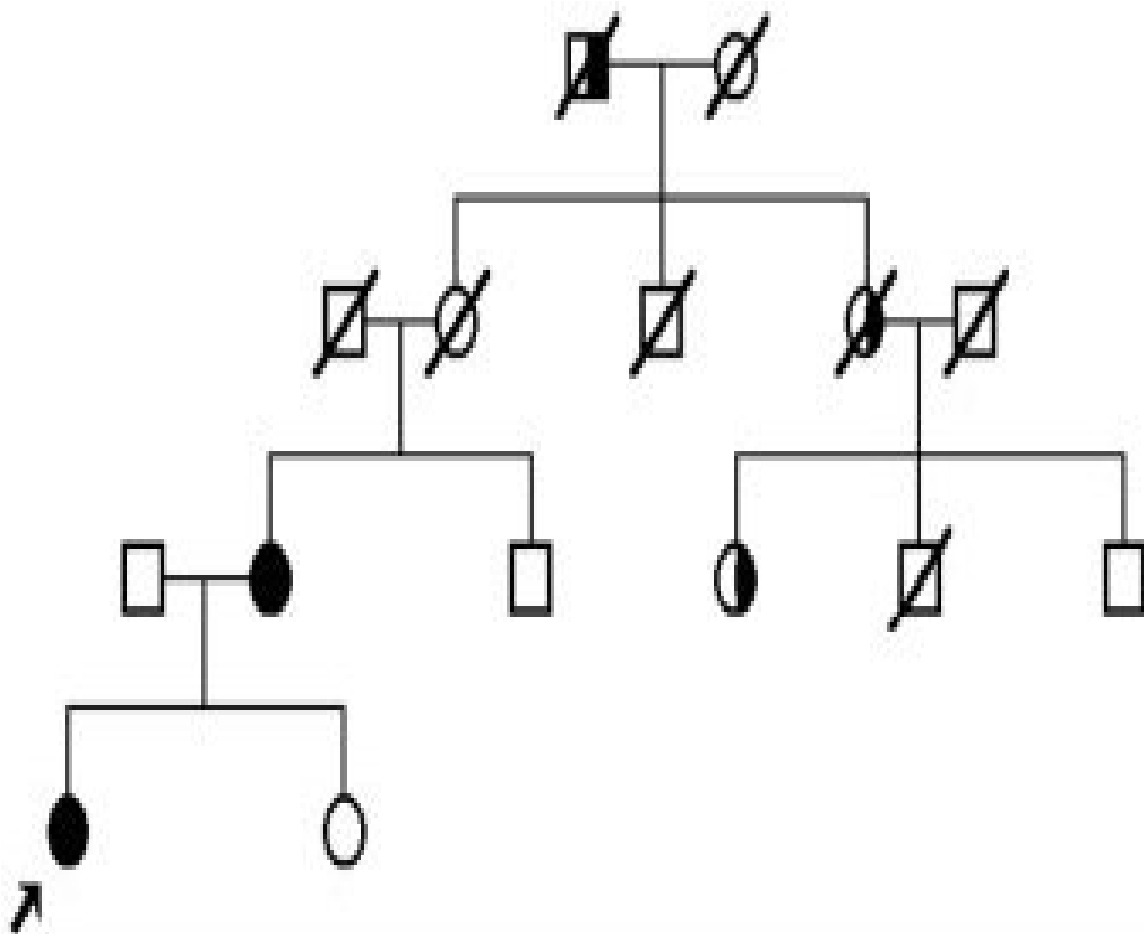


Figura 6. Albero geologico della famiglia PINK6

BIBLIOGRAFIA

1. Abelevich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A. Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 2000. 25: 239-252
2. Bialecka M, Hui S, Klodowska-Duda G, Opala G, Tan EK, Drozdziak M. Analysis of LRRK2 G2019S and I2020T mutations in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2005 Dec 16;390(1):1-3.
3. Bonifati V. Genetics of Parkinson's disease. *Minerva Med* 2005; 96: 175-186
4. Braak H, Braak E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000. 247 Suppl 2:II3-10
5. Broussolle E, Defuentes G., Plauchu H., Chazot G. Frequences et profil clinique des formes familiales de maladie de Parkinson. *Rev. Neurol.* 1997. 153: 406-411
6. Cantello R, Gianelli M, Bettucci D, Civardi C, De Angelis MS, Mutani R. Parkinson's disease rigidity: Magnetic motor evoked potentials in a small hand muscle. *Neurology* 1991. 41:1449-1456
7. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004. 364:1167-1169.

8. Clayton DF, and George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci* 1998. 21: 249-254
9. Clark LN, Afridi S, Karlins E, Wang Y, Mejia-Santana H, Harris J, Louis ED, Cote LJ, Andrews H, Fahn S, Waters C, Ford B, Frucht S, Ottman R, Marder K. LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Sardinia--A Mediterranean genetic isolate *Arch Neurol*. 2006 Apr;63(4):548-52.
10. Cossu G, van Doeselaar M, Deriu M, Melis M, Molari A, Di Fonzo A, Oostra BA, Bonifati V. LRRK2 mutations and Parkinson's disease in Sardinia--A Mediterranean genetic isolate . *Parkinsonism Relat Disord*. 2007 Feb;13(1):17-21. Epub 2006 Oct 24.
11. Daniel SE, Lees AJ. Parkinson's Disease Society Brain Bank, London: overview and research. Parkinson's Disease Society Brain Bank, Institute of Neurology, London, U.K. *J Neural Transm Suppl*. 1993; 39:165-72.
12. Darios F, Corti O, Lucking CB, Hampe C, Muriel MP, Abbas N, Gu WJ, Hirsch EC, Rooney T, Ruberg M, Brice A. 2003. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondriaindependent cell death. *Hum Mol Genet* 12:517-526.
13. Davey NJ, Dick JPR, Ellaway PH. Raised motor cortical threshold associated with bradykinesia as revealed by transcranial magnetic stimulation in normal man and Parkinson's disease. *J Physiol* 1991. 438:35P

14. de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alperovitch A, Rocca WA. Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997. 62:10-5.
15. Di Fonzo A, Rohe CF, Ferreira J, Chien HF, Vacca L, Stocchi F, Guedes L, Fabrizio E, Manfredi M, Vanacore N, Goldwurm S, Breedveld G, Sampaio C, Meco G, Barbosa E, Oostra BA, Bonifati V, Italian Parkinson Genetics Network. A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease. *Lancet* 2005. 365:412-415.
16. Fahn S, Elton RI, and members of the UPDRS Development Committee (1987) Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne DB, Goldstein M (eds) *Recent Developments in Parkinson's disease*, vol 2. Florham Park, NJ: MacMillan Health Care Information, pp 153-163
17. Farrer M, Gwinn-Hardy K, Muenter M. A chromosome 4p aptotype segregating with Parkinson's disease and postural tremor. *Hum Mol Genet* 1998. 8: 81-85
18. Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1991. 55(3):259-72

19. Funayama M, Hasegawa K, Kowa H, Saito M, Tsuji S, Obata F. A new locus for Parkinson's disease (Park8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann Neurol* 2002. 51: 296-301
20. Fung HC, Chen CM, Hardy J, Hernandez D, Singleton A, Wu YR. Lack of G2019S LRRK2 mutation in a cohort of Taiwanese with sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006. 21:880-881.
21. Giasson BI, Duda JE, Quinn SM, Zhang B, Trojanowski JQ, Lee VM. Neuronal α -synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human α -synuclein. *Neuron* 2002. 34: 521-533
22. Gilks WP, Abou-Sleiman PM, Gandhi S, Jain S, Singleton A, Lees AJ, Shaw K, Bhatia KP, Bonifati V, Quinn NP, Lynch J, Healy DG, Holton JL, Revesz T, Wood NW. A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease. *Lancet* 2005. 365:415-416.
23. Golbe LI., Di Iorio G., Sanges G., Golbe LI, Di Iorio G, Sanges G, Lazzarini AM, La Sala S, Bonavita V, Duvoisin RC. Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. *A. Neurol.* 1996; 40: 767-775
24. Goldwurm S, Zinica M, Di Fonzo A, Gasparina D, Siria C, Erik J. Simonsb, van Doeselaar M, Tesela S, Antonini A, Vanesia M, Zecchinellia A, Mariania C, Meuccia N, Sacilotto G, Cilia R, Ioannis U. Isaiasa A. Sonetti A, Sironia F, Ricca S, Oostra B, Bonifati V, Pezzoli G. LRRK2 G2019S mutation and Parkinson's disease: A clinical, neuropsychological and neuropsychiatric study

in a large Italian sample. *Parkinsonism and Related Disorders* 12 (2006) 410–419

25. Goldwurm S, Zini M, Di Fonzo A, De Gaspari D, Siri C, Simons EJ, van Doeselaar M, Tesei S, Antonini A, Canesi M, Zecchinelli A, Mariani C, Meucci N, Sacilotto G, Cilia R, Isaias IU, Bonetti A, Sironi F, Ricca S, Oostra BA, Bonifati V, Pezzoli G. Alpha-synuclein facilitates the toxicity of oxidized catechol metabolites: implications for selective neurodegeneration in Parkinson's disease. *FEBS Lett* 2006. 580: 2147–2152.
26. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila parkin* mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003. 100:4078–4083.
27. Hicks AA, Pétursson H, Jónsson T, Stefánsson H, Jóhannsdóttir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefánsson K, Sveinbjörnsdóttir S. A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2002. 52: 549-555
28. Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967. 17:427–442
29. Ibáñez P, Lesage S, Lohmann E, Thobois S, De Michele G, Borg M, Agid Y, Dürr A, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. Mutation analysis of the PINK1 gene in early-onset parkinsonism in Europe and North Africa. *Brain* 2006 ; 129(pt3) : 689-694

30. Johnson J, Hague SM, Hanson M, Gibson A, Wilson KE, Evans EW, Singleton AA, McInerney-Leo A, Nussbaum RL, Hernandez DG, Gallardo M, McKeith IG, Burn DJ, Ryu M, Hellstrom O, Ravina B, Eerola J, Perry RH, Jaros E, Tienari P, Weiser R, Gwinn-Hardy K, Morris CM, Hardy J, Singleton AB. SNCA multiplication is not a common cause of Parkinson disease or dementia with Lewy bodies. *Neurology* 2004. Aug 10;63(3):554-6.
31. Kubo SI, Kitami T, Noda S, Shimura H, Uchiyama Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y, Hattori N. Parkin is associated with cellular vesicles. *J Neurochem* 2001. 78:42–54.
32. Kachergus J, Mata IF, Hulihan M, Taylor JP, Lincoln S, Aasly J, Gibson JM, Ross OA, Lynch T, Wiley J, Payami H, Nutt J, Maraganore DM, Czyzewski K, Styczynka M, Wszolek ZK, Farrer MJ, Toft M. Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet* 2005. 76:672–680.
33. Khan NL, Jain S, Lynch JM, et al., Khan NL, Jain S, Lynch JM, Pavese N, Abou-Sleiman P, Holton JL, Healy DG, Gilks WP, Sweeney MG, Ganguly M, Gibbons V, Gandhi S, Vaughan J, Eunson LH, Katzenschlager R, Gayton J, Lennox G, Revesz T, Nicholl D, Bhatia KP, Quinn N, Brooks D, Lees AJ, Davis MB, Piccini P, Singleton AB, Wood NW. Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical,

- pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain*. 2005 Dec;128(Pt 12):2786-96. Epub 2005 Nov 4.
34. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998. 392(6676):605-8.
35. Krüger R, Kuhn W, Müller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schöls L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 1998. 18: 106-108
36. Kuroda Y, Mitsui T, Akaike M, Azuma H, Matsumoto T Homozygous deletion mutation of the parkin gene in patients with atypical parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001. Aug;71(2):231-4.
37. Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, Lansbury PT Jr. Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol* 2002. 322:1089–1102.
38. Lesage S, Leutenegger AL, Ibanez P, Janin S, Lohmann E, Durr A, Brice A, French Parkinson's Disease Genetics Study Group. LRRK2 haplotype analyses in European and North African families with Parkinson disease: a common founder for the G2019S mutation dating from the 13th century. *Am J Hum Genet* 2005. 77:330–332.
39. Lesage S, Durr A, Tazir M, Lohmann E, Leutenegger AL, Janin S, Pollak P, Brice A. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N Engl J Med* 2006. 354:422–423.

40. Li Y, Tomiyama H, Sato K, Yoshino H, Atsumi M. Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Neurology* 2005; 64: 1955-1957
41. Lohmann E, Periquet M, Bonifati V. How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol* 2003. Aug 54:176–185
42. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T. Association between early-onset Parkinson's disease and mutation in the parkin gene. *N Engl J Med* 2000; 342: 1560-1567
43. Maraganore DM, de Andrade M, Elbaz A, Farrer MJ, Ioannidis JP, Krüger R, Rocca WA, Schneider NK, Lesnick TG, Lincoln SJ, Hulihan MM, Aasly JO, Ashizawa T, Chartier-Harlin MC, Checkoway H, Ferrarese C, Hadjigeorgiou G, Hattori N, Kawakami H, Lambert JC, Lynch T, Mellick GD, Papapetropoulos S, Parsian A, Quattrone A, Riess O, Tan EK, Van Broeckhoven C; Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium, et al, Genetic Epidemiology of Parkinson's Disease (GEO-PD) Consortium. Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease. *JAMA* 2006. 296:661–670.
44. Marongiu R, Ghezzi D, Ialongo T, Soleti F, Elia A, Cavone S, Albanese A, Altavista MC, Barone P, Brusa L, Cortelli P, Petrozzi L, Scaglione C, Stanzione P, Tinazzi M, Zeviani M, Dallapiccola B, Bentivoglio AR, Valente EM, Garavaglia B; Italian PD Study Group. Italian PD Study Group.

- Frequency and phenotypes of LRRK2 G2019S mutation in Italian patients with Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2006 Aug;21(8):1232-5
45. Marsden CD. Parkinson's disease in twins. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987. Jan; 50(1): 105-106
46. Marttila RJ, Kaprio J, Koskenvuo M, Rinne UK. Parkinson's disease in a nationwide twin cohort. *Neurology* 1988. Aug; 38(8): 1217-1219
47. Masliah Y, Ockenstein E, Veinbergs I, et al. Dopaminergic loss and inclusions body formation in α -synuclein mice; implications for neurodegenerative disorders. *Science* 2000; 18: 1265-1269
48. Mata IF, Wedemeyer WJ, Farrer MJ, Taylor JP, Gallo KA. LRRK2 in Parkinson's disease: protein domains and functional insights. *Trends Neurosci* 2006. 29:286–293.
49. Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y, Yokochi M, Kobayashi T, Igarashi S, Takano H, Sanpei K, Koike R, Mori H, Kondo T, Mizutani Y, Schäffer AA, Yamamura Y, Nakamura S, Kuzuhara S, Tsuji S, Mizuno Y. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* 1997. 60: 588-596
50. Matsuoka Y, Vila M, Lincoln S, McCormack A, Picciano M, LaFrancois J, Yu X, Dickson D, Langston WJ, McGowan E, Farrer M, Hardy J, Duff K, Przedborski S, Di Monte DA. Lack of nigral pathology in transgenic mice

- expressing human α -synuclein driven by the tyrosine hydroxylase promoter. *Neurobiol Dis* 2001; 8: 535-539
51. Murray IVJ, Lee VM, and Trojanowski JQ. Synucleinopathies pathological and molecular review. *Clinical Neuroscience Research* 2001. 1: 445-455
52. Nichols WC, Pankratz N, Hernandez D, Paisán-Ruíz C, Jain S, Halter CA, Michaels VE, Reed T, Rudolph A, Shults CW, Singleton A, Foroud T; Parkinson Study Group-PROGENI investigators. Parkinson Study Group-PROGENI investigators. Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet* 2005. Jan 29-Feb 4;365(9457):410-2.
53. Nishioka K, Li H, Kawamura R. Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's Disease. *Ann Neurol* 2006. 59 : 289-309
54. Ozelius LJ, Senthil G, Saunders-Pullman R, Ohmann E, Deligtisch A, Tagliati M, Hunt AL, Klein C, Henick B, Hailpern SM, Lipton RB, Soto-Valencia J, Risch N, Bressman SB. LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *N Engl J Med* 2006. 354:424–425.
55. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, van der Brug M, Lopez de Munain A, Aparicio S, Gil AM, Khan N, Johnson J, Martinez JR, Nicholl D, Carrera IM, Pena AS, de Silva R, Lees A, Marti-Masso JF, Perez-Tur J, Wood NW, Singleton AB. 2004. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44:595–600.

56. Pals P, Lincoln S, Manning J, Heckman M, Skipper L, Hulihan M, Van den Broeck M, De Pooter T, Cras P, Crook J, and others. 2004. Alphasynuclein promoter confers susceptibility to Parkinson's disease. *Ann Neurol* 56:591–595.
57. Payami H, Larsen K, Bernard S, Nutt J. Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. *Ann. Neurol* 1994. 36: 659-661
58. Pankratz N, Nichols WC, Uniacke SK, Halter C, Murrell J, Rudolph A, Shults CW, Conneally PM, Foroud T; Parkinson Study Group. Parkinson Study Group. Genome-wide linkage analysis and evidence of gene-by-gene interactions in a sample of 362 multiplex Parkinson disease families. *Hum Mol Genet* 2003. 12(20):2599-608
59. Pesah Y, Pham T, Burgess H, Middlebrooks B, Verstreken P, Zhou Y, Harding M, Bellen H, Mardon G. *Drosophila parkin* mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. *Development* 2004. 131:2183–2194.
60. Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996; 274: 1197-1199
61. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276: 2046-2047

62. Rohe CF, Montagna P, Breedveld G, Cortelli P, Oostra BA, Bonifati V.
Homozygous PINK1 C-terminus mutation causing early-onset parkinsonism.
Ann Neurol 2004. 56:427–431.
63. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. Nat Genet 2000. 25:302–305.
64. Skipper L, Li Y, Bonnard C, Pavanni R, Yih Y, Chua E, Sung WK, Tan L, Wong MC, Tan EK, Liu J. Comprehensive evaluation of common genetic variation within LRRK2 reveals evidence for association with sporadic Parkinson's disease. Hum Mol Genet 2005b. 14:3549–3556.
65. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. Nature. 1997 Aug 28;388(6645):839-40.
Spira PJ, Sharpe DM, Halliday G, Cavanagh J, Nicholson GA. Clinical and pathological features of parkinsonism syndrome in a family with an Ala53Thr α -synuclein mutation. Ann. Neurol 2001. 49: 313-319
66. Squillaro T, Cambi F, Ciacci G, Rossi S, Ulivelli M, Malandrini A, Mencarelli MA, Mari F, Renieri A, Ariani F. Frequency of the LRRK2 G2019S mutation in Italian patients affected by Parkinson's disease. J Hum Genet. 2007; 52(3):201-4. Epub 2007 Jan 18.
67. Sveinbjornsdottir S, et al. Familial aggregation of Parkinson's disease in Iceland. N Engl J med 2000. 343: 1765-1770

68. Tan EK, Chai A, Teo YY, Zhao Y, Tan C, Shen H, Chandran VR, Teoh ML, Yih Y, Pavanni R, Wong MC, Puvan K, Lo YL, Yap E. Alpha-synuclein haplotypes implicated in the risk of Parkinson's disease. *Neurology* 2004a. 62: 128-131
69. Tan EK, Shen H, Tan LC, Farrer M, Yew K, Chua E, Jamora RD, Puvan K, Puong KY, Zhao Y, Pavanni R, Wong MC, Yih Y, Skipper L, Liu JJ. The G2019 S mutation is uncommon in Asian cohort of Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 2005d. 384: 327-329
70. Tan EK, Yew K, Chua E, Shen H, Jamora RD, Lee E, Puong KY, Zhao Y, Pavanni R, Wong MC, Puvan K, Yih Y, Tan LC. Analysis of PINK1 in Asian patients with familial parkinsonism. *Clin Genet* 2005c. 68: 468-470.
71. Tan EK, Yew K, Chua E, Puvan K, Shen H, Lee E, Puong KY, Zhao Y, Pavanni R, Wong MC, Jamora D, de Silva D, Moe KT, Woon FP, Yuen Y, Tan L. PINK1 Mutations in sporadic early onset Parkinson's disease. *Mov Disord* 2006c; 21: 789-793
72. Tan EK, Zhao Y, Skipper L, Tan MG, Di Fonzo A, Sun L, Fook-Chong S, Tang S, Chua E, Yuen Y, Tan L, Pavanni R, Wong MC, Kolatkar P, Lu CS, Bonifati V, Liu JJ. The LRRK2 Gly2385R variant is associated with risk of Parkinson's disease: clinical and genetic evidence. *Hum Genet* 2007b. 120: 857-863
73. Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, Ellenberg J, Chan P, Mayeux R. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 1999. 281: 341-346

74. Valente E., Bentivoglio AR, Cassetta E. Identification of a novel primary torsion dystonia locus (DYT 13) on chromosome 1p36 in an Italian family with cranial-cervical or upper limb onset. *Neurol Sci* 2001. 22: 95-96
75. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks, WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. Hereditary early-onset Parkinson disease caused by mutation in Pink1. *Science* 2004; 304: 1158-1160.
76. van de Warrenburg BP, Lammens M, Lücking CB, Denèfle P, Wesseling P, Booi J, Praamstra P, Quinn N, Brice A, Horstink MW. Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology* 2001 Feb 27;56(4):555-7
77. Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Bloch DA, Nelson LM. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol.* 2003 Jun 1;157(11):1015-22.
78. van der Putten H, Wiederhold KH, Probst A, Barbieri S, Mistl C, Danner S, Kauffmann S, Hofele K, Spooren WP, Ruegg MA, Lin S, Caroni P, Sommer B, Tolnay M, Bilbe G. Neuropathology in mice expressing human alpha-synuclein. *J Neurosci* 2000. 20: 6021-6029

79. Ward CD, Duvoisin RC, Ince SE, Nutt JD, Eldridge R, Calne DB. Parkinson's disease in 65 pairs of twins in a set of quadruplets. *Neurology* 1983. Jul; 33(7): 815-24
80. Xiromerisiou G, Hadjigeorgiou GM, Gourbali V, Johnson J, Papakonstantinou I, Papadimitriou A, Singleton AB. 2007 Screening for SNCA and LRRK2 mutations in Greek sporadic and autosomal dominant Parkinson's disease: identification of two novel LRRK2 variants *Jan*;14(1):7-11.
81. Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atares B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Munoz DG, de Yebenes JG. 2004. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004. 55:164–173.
82. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, Lincoln S, Kachergus J, Hulihan M, Uitti RJ, Calne DB, Stoessl AJ, Pfeiffer RF, Patenge N, Carbajal IC, Vieregge P, Asmus F, Muller-Myhsok B, Dickson DW, Meitinger T, Strom TM, Wszolek ZK, Gasser T. Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 2004. 44:601–607.
83. Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM. Parkin function as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci* 2000 USA. 97: 13354-13359

