

UNIVERSIDAD DE ALCALA DE HENARES
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA



ESTUDIO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON
FAMILIAR CON MICROARRAYS DE SNPs DE ALTA
DENSIDAD

TESIS DOCTORAL
MARIA SAGRARIO MANZANO PALOMO
ALCALA DE HENARES 2008

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar agradecer al Dr. Jiménez Escrig su confianza en mí. La oportunidad de trabajar con él, compartir su pasión por la Neurogenética y descubrir las ventajas de ver las enfermedades desde una correcta y completa perspectiva: clínica y básica.

También quisiera hacer mención especial a los que han sufrido conmigo los sinsabores y alegrías que conlleva la realización de una tesis doctoral. A aquellos que soportan la dura carga de los desvelos, dudas, incertidumbres y fracasos con los que vas tropezando por el camino, y que te tienden su mano para volver a levantarte. Hablo de mi madre Sagrario, mi padre Pedro, mi abuela Alejandra, mi abuelo Isidro y, por supuesto, mi hermana Laura, que como nadie han sabido comprenderme y apoyarme siempre, incondicionales.

Ahora quisiera destacar a todos aquellos que han permitido que esta tesis vea el final. Todos los investigadores de las distintas áreas que con sus conocimientos, trabajo y apoyo también han depositado su confianza en este proyecto. Al Dr. Oresanz y a Maica Azuara (Departamento de Investigación del Hospital Ramón y Cajal, Madrid), a la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares de Madrid, al Dr. Kulisevsky (Unidad de trastornos de Movimiento, Servicio de Neurología, Hospital de la Santa Cruz y San Pablo, Barcelona), al Dr. Rábano (Departamento de Anatomía Patológica, Fundación Hospital Alcorcón, Madrid), al Dr. Florian Wagner (Affymetrix Service, Berlin), al Dr. Morán y Dra Jiménez (Servicio de Neurología, Hospital de Soria) y a Juan Carlos Cerveró por su inestimable ayuda a discernir la genealogía de las familias.

No olvidarme de todos mis amigos tanto del ámbito médico como no médico que me han sabido y querido apoyar y animar, y por supuesto a los pacientes, ya que sin su colaboración totalmente desinteresada la Medicina jamás podría avanzar.

Finalmente, agradecemos la ayuda económica que nos concedió la Fundación Ramón Areces para la realización de este estudio.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AIC Akaike information criteria

ADN Acido Desoxirribonucleico

A Alanina

ASC Análisis de Segregación Compleja

BTIN Banco de Tejidos para la Investigación Neurológica

CERAD Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease

C Cisteina

CL Cuerpos de Lewy

CNAT Copy Number Analysis Tool

CNV Copy Number Variation

D Aspártico

G de l. grados de libertad

DM Dynamic Model algorithm

E Glutámico

EA Enfermedad de Alzheimer

EP Enfermedad de Parkinson

F Fenilalanina

G Glicina

GTTYPE Affimetrix GeneChip® Genotyping Analysis

GRR's Riesgo Relativo de Genotipo

H Histidina

IGB Integrated Genomic Browser

IBD Identidad por descendencia

IBS Identidad por estado

I Isoleucina

K Lisina

L Leucina

LRRK2 leucine-rich repeat kinase 2

MPTP N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

M Metionina

N Asparagina

PAP Pedigree Analysis Package

P Prolina

PCR Polymerase Chain Reaction

PINK 1 PTEN-induced kinase 1

Q Glutamina

R Arginina

S Serina

SNC Sistema Nervioso Central

SNCA alfa-sinucleina

SNP Single Nucleotide Polymorphism

T Treonina

UCHL 1 Ubiquitina Carboxiterminal Hidrolasa 1

UCSC Browser *University of California Santa Cruz Browser*

UPDRS Unified Parkinson Disease Rating Scale

V Valina

W Triptófano

Y Tirosina

CONTENIDOS

CONTENIDOS

1. HIPOTESIS.
2. INTRODUCCION.
3. REVISION BIBLIOGRAFICA.
 - 3.1. EPIDEMIOLOGIA.
 - 3.2. CARACTERISTICAS PATOLOGICAS Y CLINICAS.
 - 3.3. FACTORES DE RIESGO AMBIENTALES.
 - 3.3.1. INFECCIONES.
 - 3.3.2. TABACO.
 - 3.3.3. FACTORES QUIMICOS Y OTROS.
 - 3.4. GENETICA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.
 - 3.4.1. EPIDEMIOLOGIA GENETICA.
 - 3.4.2. GENETICA DE LAS ENFERMEDADES COMPLEJAS.
 - 3.4.3. GENETICA MOLECULAR DE LAS FORMAS FAMILIARES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.
 - 3.5. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON A TRAVES DE LOS GENES CONOCIDOS. PAPEL DE LA MITOCONDRIA.
4. OBJETIVOS.
5. METODOS.
 - 5.1. RECLUTAMIENTO DE LAS FAMILIAS.
 - 5.2. SELECCION DE LOS PACIENTES. CARACTERISTICAS FENOTIPICAS.
 - 5.3. CONSIDERACIONES ETICAS DEL ESTUDIO.
 - 5.4. ANALISIS DE SEGREGACION COMPLEJA. "POINTER SOFTWARE".
 - 5.5. ESTUDIOS GENETICO MOLECULARES.
 - 5.5.1. EXTRACCION DE DNA.
 - 5.5.2. EXCLUSION DE GENES RECESIVOS YA DESCRITOS.
 - 5.5.3. EXCLUSION DE MUTACIONES EN EL GEN α -SINUCLINA Y DE LA MUTACION COMUN LRRK2.

- 5.5.4. ESTUDIO DE LAS FAMILIAS CON ARRAYS DE ALTA DENSIDAD.
 - 5.5.5. MAPEO DE HOMOZIGOSIDAD DE LAS REGIONES GENETICAS LIGADAS A LA ENFERMEDAD DE PARKINSON MEDIANTE UN ARRAY DE ALTA DENSIDAD DE SNPS (500K) CON EL PROGRAMA PLINK.
 - 5.5.6. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD EN EL NUMERO DE COPIAS GENETICAS CON EL PROGRAMA CNAT (COPY NUMBER ANALYSIS TOOL).
6. RESULTADOS.
 - 6.1. AGREGADOS FAMILIARES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON.
 - 6.2. ANALISIS DE SEGREGACION COMPLEJA.
 - 6.3. GENETICA MOLECULAR DE LOS GENES CONOCIDOS.
 - 6.4. MAPEO DE HOMOZIGOSIDAD DE LAS REGIONES GENETICAS LIGADAS A LA ENFERMEDAD DE PARKINSON MEDIANTE UN ARRAY DE ALTA DENSIDAD DE SNPS (500 K) CON EL PROGRAMA PLINK.
 - 6.4.1. MAPEO POR HOMOZIGOSIDAD.
 - 6.5. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD EN EL NUMERO DE COPIAS GENETICAS CON EL PROGRAMA CNAT (COPY NUMBER ANALYSIS TOOL).
7. DISCUSION.
 - 7.1. ESTUDIOS DE AGREGADOS FAMILIARES.
 - 7.2. ANALISIS DE SEGREGACION COMPLEJA.
 - 7.3. GENETICA MOLECULAR EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.
 - 7.4. CONSIDERACIONES METODOLOGICAS.
 - 7.5. BIOLOGIA DE LOS GENES LOCALIZADOS.
 - 7.6. PERSPECTIVAS FUTURAS.
8. CONCLUSIONES.
 9. ENGLISH SUMMARY.
 10. BIBLIOGRAFIA.

11. INDICE.

12. APENDICE.

HIPOTESIS

1. HIPOTESIS

Los genes causantes de enfermedad de Parkinson (EP) familiar descritos actualmente apenas explican el 50% de las formas hereditarias. Deben existir otros genes (cuantitativamente hablando algunos estudios cifran en más de 20) que podrían ser causales de estas formas de EP no explicables por los hasta ahora descritos.

Los microarrays de SNPs de alta densidad que han aparecido recientemente suponen una herramienta sencilla y eficaz ya que permiten estudiar formas familiares de enfermedad de Parkinson que no son susceptibles de análisis con las técnicas clásicas de ligamiento o asociación.

El conocimiento de estos genes nos permitirá saber de forma completa, cuales son los mecanismos implicados en la génesis de la enfermedad. Por tanto, su estudio es una labor necesaria, tanto para conocer la patogenia de la enfermedad, como para poder llevar a cabo una detección precoz de estos casos, incluso en estadios pre-sintomáticos, y así poder instaurar un tratamiento preventivo.

INTRODUCCION

2. INTRODUCCION

La EP idiopática es la segunda causa más común de enfermedad neurodegenerativa después de la Enfermedad de Alzheimer. Se manifiesta clínicamente por temblor, lentitud en la ejecución del movimiento (bradicinesia) y rigidez. Su sustrato neuropatológico es la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*.

Actualmente conocemos que, en la mayoría de los casos, se trata de una enfermedad compleja con una influencia dual en su etiopatogenia, tanto de factores ambientales como genéticos, pero desconocemos los mecanismos exactos que subyacen.

A finales del siglo XIX, Gowers (1886) señaló que en la EP “...*in any occasions the influence of the inheritance could be important...*”. Esta fue la opinión general entre los investigadores hasta 1980, y estaba fundamentada en los estudios de Mjöhnes (1949), así como en casos aislados descritos en la literatura. En 1980, comenzaron a realizarse estudios de concordancia de gemelos, que junto con la observación que la toxina N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) podía producir degeneración dopaminérgica nigroestriatal y parkinsonismo, desvió la atención a los agentes ambientales como factores de riesgo de la EP (Nicklas y Heikkilä 1985). Diferentes factores ambientales que se han considerado son la ingesta de café o el hábito tabáquico como protectores, y como favorecedores, el traumatismo craneoencefálico y los pesticidas.

Si centramos nuestra atención en la genética, tema de esta tesis, el conocimiento de los factores genéticos de la enfermedad tiene una importancia fundamental, por cuanto permite saber cuales son las rutas metabólicas implicadas en la fisiopatología de la enfermedad.

Planteamos el estudio de familias con EP, que no son susceptibles de análisis mediante las técnicas clásicas de ligamiento. En estas familias se ha hecho un estudio inicial descartando la participación de los genes causales implicados en las formas Mendelianas recesivas conocidas (PARKIN, DJ-1, PINK1). También estudiamos tanto α -sinucleína (SNCA) como LRRK2, a pesar de su herencia autosómico dominante, dada su importancia desde un punto de vista patogénico (la primera), como geográfico (Sur de Europa), la segunda.

Realizamos un Análisis de Segregación Compleja (ASC) siguiendo el modelo unificado de Lalouel, implementado con el software “Pointer”, en un intento de averiguar el papel de un gen Mendeliano y la penetrancia del mismo en nuestros pedigrees.

Finalmente, mapeamos las regiones genéticas ligadas a la EP mediante un array de alta densidad de SNPs (Affimetrix 500K). Dicho array fue analizado desde un punto de vista de segregación examinándose regiones de homocigosidad mediante el sistema analítico PLINK y por otra parte se estudió la presencia de variaciones en el número de copias génicas (delecciones, duplicaciones y triplicaciones) con un sistema de análisis computarizado de variabilidad de copia génica (CNAT, *copy number analysis tool*).

La variación en el genoma humano supone un amplio abanico de posibilidades que comprende desde anomalías microscópicas visibles en los cromosomas hasta cambios en los SNPs (Redon et al., 2006). Recientemente existen varios estudios que han descubierto una abundante variación en el número de copias submicroscópicas de los segmentos de DNA que, en tamaño, comprende desde kilobases (Kb) hasta megabases (Mb) (Conrad and Antonarakis, 2007; Conrad et al., 2006; Hinds et al., 2006; Lee et al., 2007; Locke et al., 2006; McCarroll and Altshuler, 2007; Sebat et al., 2004; Sharp et al., 2005; Tuzun et al., 2005). En conjunto, tanto las delecciones, como las inserciones, duplicaciones y variaciones complejas en múltiples localizaciones del genoma se denominan *Copy Number Variations* (CNVs) o *Copy Number Polymorphisms* (CNPs). Este fenómeno está descrito tanto en humanos (Feuk et al., 2006) como en otros mamíferos (Freeman et al., 2006). Definimos CNV como los segmentos de DNA de 1 Kb o mayores que presentan una variación en el número de copias si se compara con el genoma de referencia. Un CNV puede ser simple desde el punto de vista estructural, como por ejemplo una duplicación, o puede suponer una ganancia o pérdida compleja de secuencias homólogas en múltiples sitios del genoma. Hace aproximadamente 70 años ya fue descrita una asociación de CNV con el fenotipo (duplicación del gen Bar en *Drosophila melanogaster*) responsable la forma ocular Bar (Bridges, 1936). Se sabe desde entonces que los CNVs influyen tanto en la expresión del gen, como en la variación fenotípica, en la adaptación genómica (genes disruptores) y en la alteración de la dosis del gen (Buckland, 2003; Nguyen et al., 2006; Repping et al., 2006). Este fenómeno condicionaba una microdelección o microduplicación (Inoue and Lupski, 2002; Lupski and Stankiewicz, 2005; Shaw-Smith et al., 2004) y por tanto la enfermedad. Los CNVs a menudo representan una minoría apreciable de alelos causales asociados a enfermedades específicas como el síndrome de CHARGE, la EP o la Enfermedad de Alzheimer (Rovelet-Lecrux et al., 2006). Además, los CNVs

pueden influir en la expresión de genes de forma indirecta, predisponiendo a cambios genéticos deletéreos o siendo en sí mismos sustrato de cambios cromosómicos en evolución (Freeman et al., 2006; Lupski and Stankiewicz, 2005). Hasta la fecha no hay estudios de CNV en enfermedades neurodegenerativas.

A pesar de que existen diversas técnicas de biología molecular que permiten realizar una aproximación a la detección de CNV, para esta finalidad los arrays de alta densidad ofrecen el método global con mejor relación coste-eficacia, de alta resolución a la hora de realizar un rastreo de todas las características estructurales del genoma humano (Sharp et al., 2005; Speicher and Carter, 2005; Urban et al., 2006).

REVISION BIBLIOGRAFICA

3. REVISION BIBLIOGRAFICA.

3.1. EPIDEMIOLOGIA.

La Enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por James Parkinson en "*An Essay on the Shaking Palsy*", publicado en 1817. En su libro, J. Parkinson describió seis casos con las características típicas de esta enfermedad, incluyendo la marcha festinante, el inicio insidioso y el curso progresivo hasta estadios avanzados, llegando a una severa caquexia y una imposibilidad para la deambulación. Todos los pacientes tenían entre 50 y 72 años y eran varones (Gowers WT, 1886). Se añadió a la descripción la rigidez muscular, la bradicinesia, la seborrea y el deterioro cognitivo (Duvoisin, 1992).

Hoy en día, sabemos que la EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la Enfermedad de Alzheimer. La incidencia estimada se sitúa entre 16-19/100.000 habitantes año, de acuerdo a los datos recogidos de estudios con similares características metodológicas. En la mayoría de los estudios, el pico de incidencia se sitúa entre los 70-79 años y la media de edad de inicio de los síntomas entre 60-65 años (Twelves et al., 2003).

La prevalencia ajustada por edad se incrementa sustancialmente con la edad, pasando de 60/100.000 habitantes en el rango de 65 a 69 años, a 350/100.000 habitantes entre los 85 y los 89 años. Se estima que el riesgo de padecer la enfermedad es de un 2% para los varones y 1,3% para las mujeres. El predominio de varones afectados ha sido reproducido en otros estudios, pero no se conoce la causa de este hecho (Baldereschi et al., 2000; Mayeux, 1998). Respecto a los factores involucrados en la variabilidad geográfica, son igualmente desconocidos, aunque la influencia ambiental es una explicación sugerida, siendo las cifras de prevalencia más bajas para China, Japón y África (Zhang and Roman, 1993). En Europa, la prevalencia es similar en cada uno de los países (de Rijk et al., 1997). De igual manera el sustrato genético de forma concomitante podría intervenir, tal y como se observa en estudios de prevalencia de la enfermedad en población Norteamericana según etnias, siendo superior en Hispanos y Afro-americanos que en Norteamericanos (Mayeux et al., 1995).

3.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS.

Los hallazgos neuropatológicos característicos de la EP son la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la *pars compacta* de la *substantia nigra* y la formación de inclusiones fibrilares citoplasmáticas llamadas cuerpos de Lewy (CL). Los CL también se encuentran en otras localizaciones tales como el *nucleus basalis de Meynert*, el núcleo dorsal motor del vago, hipotálamo y *locus coeruleus* (Alvord, Jr. et al., 1974; Duffy P and Tennyson.VM., 1965; Forno and Norville, 1981; Jellinger, 1987). Con técnicas de inmunohistoquímica empleando anticuerpos monoclonales contra α -sinucleína se ha podido demostrar la presencia de esta proteína en ellos (Spillantini et al., 1997; Spillantini et al., 1998; Wakabayashi et al., 1997).

Es llamativa la presencia de los hallazgos descritos en autopsias realizadas a individuos ancianos no afectados de la EP. Aproximadamente el 1% de los individuos con 60-70 años y entre el 6-10% de los mayores de 80 años presentan todos los hallazgos. Su significado en la práctica clínica podría orientar a formas subclínicas de la enfermedad (Alvord, Jr. et al., 1974; Jellinger, 1987). Para que aparezca sintomatología clínica es necesario que se pierda al menos un 80% de las neuronas dopaminérgicas.

Parkinsonismo o síndrome parkinsoniano son términos empleados para toda entidad clínica caracterizada por al menos dos de las siguientes manifestaciones motoras: temblor, rigidez muscular y bradicinesia. Las formas idiopáticas o enfermedad de Parkinson constituyen aproximadamente el 85% del total de casos. Su curso es insidioso, generalmente unilateral y su inicio en la mayoría de los casos en la edad media de la vida. Su diagnóstico es clínico, excluyendo otras entidades que pueden cursar clínicamente de forma muy similar (demencia por cuerpos de Lewy, parkinsonismo vascular, parkinsonismo inducido por drogas, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistemas, degeneración córticobasal, etc). Los rasgos clínicos que señalan un parkinsonismo atípico son, entre otros, una rápida progresión, pobre o nula respuesta al tratamiento con L-dopa, inestabilidad postural precoz, parálisis supranuclear de la mirada, disautonomía precoz, y la presencia de signos piramidales o cerebelosos. Los criterios diagnósticos más difundidos son los United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria (Daniel and Lees, 1993). Sin embargo, empleando estos criterios solo se alcanza una exactitud diagnóstica comparativamente con la autopsia en un 75% de los casos.

3.3.FACTORES AMBIENTALES.

3.3.1. INFECCIOSOS.

En 1918, la encefalitis letárgica o enfermedad de Von Economo fue una pandemia que trajo consigo un gran número de casos de parkinsonismo con rasgos peculiares como corea, distonía, tics y alteraciones de la conducta. Fue el punto de partida para lanzar la hipótesis infecciosa como causa de un daño selectivo de la *substantia nigra*. Sin embargo, todos los esfuerzos empleados en corroborar dicha hipótesis han sido en vano ya que no se ha podido reproducir la enfermedad en animales de experimentación (primates), así como no se ha encontrado positividad para ningún virus en los estudios serológicos de cerebros de autopsias de dichos pacientes.

3.3.2. TABACO.

En la década de los sesenta, los investigadores observaron una relación inversa entre el hábito tabáquico y la EP. Entre los estudios llevados a cabo hasta la fecha (Haack et al., 1981;Kondo, 1987;Nefzger et al., 1968;Scott et al., 2005), la mayoría confirman esta teoría, con un riesgo estimado del 0.5 (los fumadores reducen su riesgo de padecer la enfermedad a la mitad respecto a los no-fumadores).

3.3.3. FACTORES QUIMICOS Y OTROS.

El hecho de que la toxina N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) pudiera causar una degeneración dopaminérgica nigroestriatal y parkinsonismo, supuso el punto de partida de la hipótesis medio-ambiental en la génesis de la enfermedad (Nicklas et al., 1985).

Un gran número de sustancias químicas con similar estructura al MPTP se han descrito como potenciales factores de riesgo, y estudios epidemiológicos avalan, con suficiente evidencia, que la exposición crónica a pesticidas incrementa el riesgo de padecer EP (Hubble et al., 1993;Semchuk and Love, 1995;Tanner, 1989).

Otros factores ambientales considerados son el traumatismo craneoencefálico como factor de riesgo, (Semchuk et al., 1993), que se asocia a un adelanto en la edad de inicio de 3 años (Maher et al., 2002), y la ingesta de café como factor protector.

3.4.GENETICA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.

3.4.1. EPIDEMIOLOGIA GENETICA.

Las primeras teorías sobre la etiología de la EP se sustentaban en un origen genético. El primer estudio genético fue llevado a cabo por Mjöhnes en Suecia en 1949, que revisó una serie de familias con múltiples afectos de EP y concluyó que el patrón de herencia en éstas era (autosómico dominante), con una penetrancia del 60%. A pesar de varios problemas de índole metodológico, este estudio sentó las bases del concepto moderno de genética de la EP. Entre 1982 y 1984, varios autores publicaron estudios en la misma línea que Mjöhnes (Roy et al., 1983).

Con los métodos estadísticos multivariantes, se ha podido constatar que la presencia de historia familiar supone un factor de riesgo fuertemente positivo para padecer la enfermedad, cifrándose entre un 13 y un 27.5% el porcentaje de pacientes que poseen un familiar de primer o segundo grado afecto de la enfermedad (Uitti et al., 1997). Se estima que el riesgo acumulativo excede al 50% para los hijos de padres afectos. Otros estudios que lo avalan se han realizado en Italia (OR 7.1-14.6) (DeMichele G. et al., 1996) o Alemania (Viergge, 1994).

Si realizamos una división por edad de inicio en agregados familiares, se ha constatado que el riesgo específico se incrementa en ocho, en los familiares de pacientes con inicio precoz, frente a tres en los de inicio tardío.

Respecto a los estudios de concordancia de gemelos, estos supusieron un factor de confusión ya que no apoyaban la hipótesis genética, al no existir diferencias en las ratios de concordancia entre gemelos mono y dizigóticos (Marttila et al., 1988; Viergge et al., 1992; Viergge et al., 1999). Solo apreciaron diferencias en grupos de inicio precoz (<50 años), con una concordancia en monozigóticos del 1.0 y en dizigóticos de 0.167, por lo que concluyeron que quizá los factores genéticos jugaban un papel importante en las formas de inicio precoz, pero no en las tardías. Sin embargo, los estudios de gemelos que se habían realizado poseían

importantes limitaciones que hacían tomar con cautela sus resultados. Se trataba de estudios transversales en su mayoría, con la excepción del estudio de Vieregge, y no eran capaces de detectar formas subclínicas y por consiguiente tendían a infraestimar. Además el grado de concordancia entre gemelos monozigóticos se incrementa con la edad. Por ello estudios de tipo longitudinal (Piccini et al., 1999) empleando PET con ^{18}F -dopa han podido detectar pérdida dopaminérgica en pre-sintomáticos desde el punto de vista clínico. Concluyen una concordancia del 75% para monozigotos y del 22% para dizigotos, independientemente de la edad de inicio.

A partir de los años 1990, los casos de agregados familiares comenzaron a estudiarse mediante técnicas de Genética Molecular, y se procedió a clonar los genes causales. La EP pasó a ser considerada una Enfermedad genéticamente compleja, con casos poco comunes de patrón de herencia Mendeliana autosómico dominante o autosómico recesivo y con una gran mayoría de casos familiares sin patrón de herencia claro, probablemente poligénicos o multifactoriales (Gosal et al., 2006).

3.4.2. GENETICA DE LAS ENFERMEDADES COMPLEJAS.

Los agregados familiares constituyen una fuente de estudio reconocida de muchas enfermedades neurodegenerativas desde hace varias décadas. Tras el descubrimiento de la genética molecular (Martin, 1999) y las características bioquímicas de estas enfermedades ha surgido la dicotomía entre las llamadas formas familiares (raras) y aparentemente no familiares (comunes, esporádicas o idiopáticas), que siempre está presente en la epidemiología genética de estas enfermedades complejas. Las formas familiares tienen patrones de herencia Mendelianos mientras que aparentemente en las formas esporádicas existe una influencia de múltiples factores genéticos que están interactuando a su vez con factores ambientales.

Los agregados familiares en una enfermedad no implican necesariamente una etiología genética. Cuando aparecen casos familiares hay que considerar la influencia dual en el patrón de herencia observado tanto de genes como del entorno. Los factores genéticos pueden ser Mendelianos con un patrón de herencia autosómico dominante, recesivo, poligénico o una mezcla de ellos. Se han propuesto varios métodos estadísticos para el análisis del efecto genético en familias con enfermedades de herencia compleja.

Cuando se procede a examinar a una familia con una determinada enfermedad en varios de sus miembros, el objetivo es determinar si el componente genético o el ambiental o ambos son los responsables del rasgo a heredar. La forma más simplista de determinar la contribución del componente genético es examinar la recurrencia de los ratios de riesgo, siendo la más popular la atribuida a Risch (Risch, 1990) y se define por

$$\lambda_R = k_R/k$$

donde R se define como la relación con el probando, k_R es la prevalencia en familiares de tipo R , y k es la prevalencia en la población general. En cualquier modelo genético

$$1 \leq \lambda_I \leq \lambda_s \leq \lambda_M$$

donde M , s y 1 son la relación suscrita que implica a los gemelos MZ, hermanos y padres (o descendencia) respectivamente. Típicamente, λ_R se calcula para los hermanos y λ_s es conocido como el riesgo relativo de los hermanos. Ejemplos de λ_s para diferentes enfermedades incluyen la Enfermedad de Huntington (donde $k_s = 0.5$, $k = 0.0001$, y $\lambda_s \approx 5,000$), CMT recesivo (donde $k_s = 0.25$, $k = 0.004$, y $\lambda_s \approx 500$) y enfermedad de Parkinson donde $k_s = 0.3$, $k = 0.1$, y $\lambda_s = 3$). En general, a mayor valor de λ_s , mayor es la influencia genética del rasgo a heredar. Sin embargo, en sí mismo λ_s no precisa un parámetro único para estimar el poder del estudio de ligamiento propuesto. Por ejemplo, en algunos modelos un λ_s tan alto como 10 no garantiza que los genes que subyacen puedan ser fácilmente mapeados por estudios de ligamiento.

El poder para detectar la influencia genética de una variante puede ser definida en terminos de Riesgo Relativo de Genotipo (GRR's) (Schaid and Sommer, 1993). Si consideramos un locus bialélico con alelos de tipo A , a y frecuencias relativas $f(A)$, $f(a)$, donde A es el alelo de susceptibilidad genética, las probabilidades condicionadas de que un individuo con un genotipo particular tenga una enfermedad D son conocidas como penetrancia y dadas por

$$f_{AA} = P(D/AA), f_{Aa} = P(D/Aa), f_{aa} = P(D/aa)$$

Los riesgos relativos de genotipos para D en este locus son

$$g_1 = f_{Aa}/f_{aa}, g_2 = f_{AA}/f_{aa}$$

La relación entre el riesgo relativo entre hermanos y el GRR depende tanto de la frecuencia del alelo en ambas frecuencias alélicas como del modo de herencia (Rybicki and Elston, 2000). Fórmulas explícitas que relacionan GRR y λ_s para modelos dominantes, recesivos, aditivos y multiplicativos se pueden encontrar en Wittke-Thompson et al. (Wittke-Thompson et al., 2005).

Cuando se discute sobre la heredabilidad de un rasgo merece la pena considerar que existen dos medidas diferentes (Abney et al., 2001). Heredabilidad en sentido extenso (denominada H^2), que se define como la proporción del total de la varianza en un rasgo que es debido a todos los componentes genéticos (aditivo, dominante y epistático), mientras que en sentido restringido (denominada h^2) se define como la proporción de la varianza fenotípica que es atribuida a la varianza genética. La varianza genética aditiva de un locus mide la varianza debida a la media de los efectos de alelos únicos. La varianza dominante de un rasgo en un locus mide la varianza debida a la interacción de alelos que constituye un genotipo. La varianza epistática es debida a la interacción de efectos entre loci. La varianza aditiva total (respectivamente, dominancia) es el sumatorio (respectivamente, dominancia) en cada locus sumados por todo el genoma. Igualmente, la varianza epistática total es el total de la varianza obtenida sumando la contribución de la varianza epistática de todos los pares de loci por todo el genoma. Típicamente, se asume que los efectos aditivos son los primeros contribuyentes del rasgo a heredar. Un resultado referente a la heredabilidad cercano a cero sugiere que casi el total de la variación es debida a causas ambientales, mientras que si es cercano a 1 implica que casi toda la variación es debida a factores genéticos.

Es importante tener en cuenta que la heredabilidad es una medida y como tal no supone algo exacto sobre como los genes determinan el fenotipo. Un punto fundamental a la hora de considerar la heredabilidad es la evaluación del patrón de segregación. El Análisis de Segregación Simple considera la proporción de afectados y no afectados en la descendencia y examina esta proporción en relación a la proporción de autosómico dominante (50%) o recesivo (25% de afectados/75% de no-afectados, en el caso más simple) y considera intervalos de confianza, teniendo en cuenta si un particular modo de transmisión es posible o puede ser rechazado. Sin embargo, el método más general para evaluar la transmisión de un rasgo entre pedigrees es el Análisis de Segregación Compleja (ASC), que evalúa la forma de herencia más adecuada de un rasgo considerando diferentes modelos, genéticos y no-genéticos, permitiendo seleccionar el modelo que obtiene los datos más fiables y adecuados. Mientras el Análisis de Segregación Simple analiza solo si la proporción de la descendencia de afectos y no-afectos en las familias es consistente con modelos Mendelianos, el ASC puede considerar patrones de transmisión más

complicados así como influencias ambientales. El ASC puede ser aplicado a cualquier estructura genealógica y trabaja tanto con rasgos cualitativos como cuantitativos.

El ASC permite conocer cual es el modelo matemático de herencia que mejor se ajusta en una familia o en un grupo de familias. Dependiendo de la información que se introduzca en el modelo es posible además conocer parámetros adicionales, como la frecuencia del gen en la población o la penetrancia de la herencia. Existen varios métodos para realizar un ASC. El más empleado es el propuesto por *Lalouel et al.* en 1983 (Lalouel et al., 1983). Dicho modelo divide la variación total de la llamada *liability* o susceptibilidad en tres componentes independientes: un locus mayor único dialélico, un *background* o predisposición poligénica y un componente ambiental (Ruiz, 1997).

Entendemos por *liability* el valor arbitrario dentro de una escala graduada por encima del cual diremos que el paciente padece una enfermedad. Dicho valor sigue una distribución normal y cambia con la edad. El concepto que subyace a este término no es más que la combinación de la tendencia innata de un sujeto a desarrollar una enfermedad unida a las circunstancias externas (Falconer DS., 1965). El modelo mixto asume que la *liability* de la enfermedad (x) puede ser descrita por una escala continua en donde un locus único dialélico Mendeliano (g), un componente poligénico (c), y un efecto ambiental (e) operan independientemente. La *liability* (x) es entonces definida como $x=g+c+e$. Las varianzas respectivas de estos parámetros se calculan como $V=G+C+E$. La contribución relativa del componente poligénico se define por H , la heredabilidad, que refleja la transmisión genética no debida a un gen mayor o a una transmisión cultural ($H=C/V$).

Los parámetros del modelo son:

Un locus mayor con dos alelos (A,a), cuyas frecuencias genotípicas tienen el siguiente equilibrio de Hardy-Weinberg,

q , la frecuencia del alelo de mayor riesgo A ;

t , la distancia genética o el desplazamiento del locus único mayor medido en desviaciones estandar en la escala de *liability* entre dos genotipos homocigotos (AA y aa);

d , grado de dominancia del locus mayor obtenido por la ecuación $d = (\mu_{Aa} - \mu_{aa}) / (\mu_{AA} - \mu_{aa})$, de tal forma que $d = 0$ corresponde a un gen recesivo, $d = 1$ corresponde a un gen dominante, $0 < d < 1$ corresponde al mismo grado de aditividad y $d = 0.5$ corresponde a la codominancia;

H la heredabilidad poligénica en los hijos (k); $H = C_k/V$

Z , el ratio de heredabilidad padre hijo; $Z=C_d/C_k$

y t_1 , t_2 and t_3 , la probabilidades respectivas de genotipos AA , Aa , y aa (transmisión del alelo A).

El modelo general contiene el mayor número de parámetros. Este modelo es entonces comparado con un modelo Mendeliano de transmisión, modelo ambiental y poligénico. Bajo un modelo Mendeliano, las probabilidades de transmisión de un alelo A denominadas genotipos AA , Aa , y aa no difieren significativamente de lo esperado desde un punto de vista Mendeliano 1, 0.5, y 0, respectivamente, mientras que en el modelo general estas probabilidades de transmisión pueden tener algún valor. Bajo el modelo ambiental estas probabilidades son todas iguales porque el modo fenotípico de un hijo no está relacionado con el del padre. Mientras que el modelo Mendeliano y ambiental pueden englobar múltiples pequeños efectos genéticos y ambientales, el modelo poligénico considera sólo los pequeños efectos genéticos así que no considera el posible efecto de un único locus mayor o el ambiente.

Existen varios softwares que pueden implementar el ASC: PAP (Hasstedt S, Cartwright P (1981) *PAP: pedigree analysis package*. Department of Medical Biophysics and Computing, University of Utah, Salt Lake City), SAGE (Case Western Reserve University Statistical Analysis for Genetic Epidemiology en <http://darwin.cwru.edu/sage/>), GAP Genetic Analysis Package (from Epicenter Software, web: <http://icarus2.hsc.usc.edu/epicenter/gap.html>) y “Pointer”. (<ftp://cedar.genetics.soton.ac.uk/pub/PROGRAMS/pointer/>). Esta variedad de software permite realizar el ASC estimando la máxima verosimilitud para los datos observados a partir de la combinación de parámetros enumerados previamente. Entre la variedad de modelos considerados se procede generalmente primero a analizar el modelo general no-restricto, que contiene el máximo de parámetros para determinar si un locus Mendeliano es probable que tenga un gran efecto en el fenotipo de interés y estimar la magnitud de la fuente genética de la variación del rasgo a heredar. Este modelo es comparado con los modelos con restricciones tales como los Mendelianos (dominante, recesivo y co-dominante), ambiental y poligénico o “modelo ausencia de gen mayor”. Esto es llevado a cabo mediante el examen de hipótesis genéticas teniendo como constantes los parámetros más relevantes d , t , q , y H , mientras que el resto de parámetros son estimados mediante la verosimilitud de los fenotipos de las familias.

Los modelos Mendelianos asumen un locus Mendeliano con dos alelos que actúan cada uno en una forma dominante, co-dominante o recesiva. El modelo de “no gen Mendeliano” asume que el riesgo de base no está influenciado por el riesgo del rasgo a heredar (por ejemplo, todas las personas que tienen el mismo riesgo específico de la enfermedad). El modelo ambiental asume que

el fenotipo del individuo depende de su exposición ambiental y es independiente del fenotipo de los padres. Existen dos parámetros para analizar la heredabilidad multifactorial. El parámetro H representa la heredabilidad poligénica en la descendencia, donde $H=C_k/V$, en la que C_k es el componente multifactorial y V es la varianza total. El segundo parámetro es Z para el cual H_Z representa la heredabilidad multifactorial en los padres, donde $Z=C_d/C_k$, es el ratio del componente multifactorial en adultos y niños. Variaciones significativas de Z de 1 sugieren una diferencia generacional en la heredabilidad multifactorial.

En el ASC, es incorrecto asumir que la frecuencia del gen es constante en todas las edades porque cualquier gen causal de una mortalidad específica debe disminuir con la edad. Los riesgos (R) pueden ser determinados empleando las cifras de mortalidad que permiten calcular la mortalidad acumulada y el riesgo (R_j), atribuido a la j th liability class, esto es

$$R_j=(I_j-M_{j-1})/(1-M_{j-1})$$

donde I_j es la incidencia acumulada del término medio y M_{j-1} es la mortalidad específica acumulada al final de la clase precedente.

Tal y como se mencionó anteriormente, los modelos son comparados mediante las likelihood ratio o razón de verosimilitud. La diferencia entre menos dos veces el logaritmo de la likelihood más una constante ($-2\ln L+k$) calculado bajo el modelo general (con m parámetros) y bajo el modelo reducido (con n parámetros) es asintóticamente distribuido mediante una χ^2 con $m-n$ grados de libertad. Otra forma de comparar hipótesis es usando el criterio de Akaike (Akaike information criterion: AIC) (Akaike HA, 1974). AIC es calculado mediante $-2\ln L+k$ más dos veces el número de parámetros libres en el modelo. El modelo con el AIC más bajo es el más se ajusta a los datos. Tiene como ventaja que un modelo no tiene porqué ser subsidiario de otro y por tanto puede ser usado para modelos no analizados.

Finalmente, decir que el ASC no solo permite determinar si un gen Mendeliano está involucrado en la herencia de un rasgo familiar sino también predice el patrón de herencia del gen hipotético, la penetrancia y la frecuencia alélica. Tomando en consideración la tasa de mortalidad edad específica (Iselius et al., 1991), la penetrancia en los portadores del gen (G') como la incidencia acumulada aproximada para los portadores del gen en la j th liability class, nos da la siguiente fórmula:

$$P_j = P(\text{aff} | G', j) + [1 - P(\text{aff} | G', j)] M'_{j-1}$$

donde la mortalidad específica del genotipo es,

$$M'_{j-1} = \{ \Sigma P(G' | \text{aff},i)(M_i - M_{i-1}) \} / \Sigma P(P' | \text{aff},i) (I_i - I_{i-1})$$

Entre las limitaciones del ASC se encuentran la necesidad de largas listas de datos muy específicos y la falta de un método fiable para determinar el tamaño muestral mínimo requerido para un nivel deseado de potencia estadística a la hora de detectar un locus Mendeliano. Así mismo es imposible distinguir el efecto de un único locus que subyace a un rasgo del efecto de dos o más loci actuando de forma independiente con similares patrones de transmisión.

Es comúnmente conocido que existen enfermedades que no se heredan de manera simple por un único gen, existiendo un cierto grado de predisposición hereditaria, que muestra una elevada incidencia entre familiares o individuos afectos respecto a la población general (Gail Pairitz J., 1998). Su aplicabilidad al estudio de enfermedades con patrones de herencia complejos parte de la pregunta: ¿qué fracción de la variación interindividual es debida a una diferencia genética entre los individuos?. Esta fracción fue denominada por Falconer “grado de determinación genética”. La aplicación práctica sería el Consejo Genético.

A la hora de aplicar lo dicho a la EP, lo primero a tener en cuenta es que se trata de una “enfermedad edad-dependiente”, en la mayoría de los casos. De tal manera que lo que habíamos denominado *liability class* se definirá basado en una distribución por “edad de inicio”. Al llevar a cabo esta aproximación, se consideraran a los familiares de primer grado todos los que tienen el mismo riesgo genético de padecer la enfermedad. Para realizar el ASC seleccionaremos familias con EP y las dividiremos en “familias nucleares” con y sin individuos afectos interrelacionados a través del “Pointer”.

3.4.3.GENETICA MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON FAMILIAR.

En el caso de formas monogénicas de la EP, existen hasta la fecha, doce formas familiares. Vamos a proceder a una breve descripción de todas ellas (ver Tabla 1).

La primera, PARK 1 (OMIM, [#168601](#)), fue descrita en 1996 en una familia Italo-Americana con miembros residiendo a ambos lados Atlántico. Los autores detectaron casos de una familia de Nueva Jersey, con un patrón de herencia autosómico dominante, y se remontaron a sus

orígenes familiares en un pueblo del Sur de Italia llamado Contursi donde se encontraron nuevos casos. El estudio de esta extensa familia, encontró ligamiento con marcadores del cromosoma 4p21. Entre los genes ubicados en esta región, la α -sinucleína (SNCA) fue considerado el gen candidato, al ser parte del depósito de las placas seniles en la EA, y en el que se descubrió la mutación A53T responsable de los casos afectos. Posteriormente, esta mutación también se ha encontrado en varias familias griegas y, de forma adicional, se han descrito otras mutaciones puntuales en este gen, como A30P en una familia alemana y E46K en una familia española con demencia por CL (ver figura 1). A pesar de que la SNCA es la proteína fundamental de los CL, las mutaciones que la afectan son extremadamente raras y descritas en escasas familias. Dichas mutaciones originan una EP sin rasgos clínicos que puedan diferenciarlos de casos esporádicos, con la salvedad de una edad de inicio algo más joven. Algunos pacientes desarrollan deterioro cognitivo y disfunción autonómica, aunque no son rasgos diferenciadores. En los hallazgos necrópsicos aparecen las características típicas descritas.

Fenómenos de multiplicación genómica de todo el gen se han ligado a la EP familiar. En concreto, duplicaciones (Chartier-Harlin et al., 2004; Farrer et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Ibanez et al., 2004), y triplicaciones (Miller et al., 2004; Singleton et al., 2004). Otra forma autosómica dominante de EP llamada PARK 4 (OMIM, #605543) que en un principio se asoció al cromosoma 4p14, en una segunda búsqueda genómica, fue relacionada con la región 4q21. El análisis de estos pacientes reveló una región triplicada que contenía 17 genes incluido el gen SNCA. Los portadores de esta triplicación tenían cuatro copias de SNCA. Otras formas por aumento en la dosis del gen SNCA son la identificada en una gran familia alemana (Singleton et al., 2003), o la encontrada en una familia suizo-americana, confirmando el mecanismo mutacional. De todo ello se ha concluido que parece existir una relación directa entre la dosis del gen, la expresión, la edad de inicio, progresión y severidad fenotípica (Farrer et al., 2004).

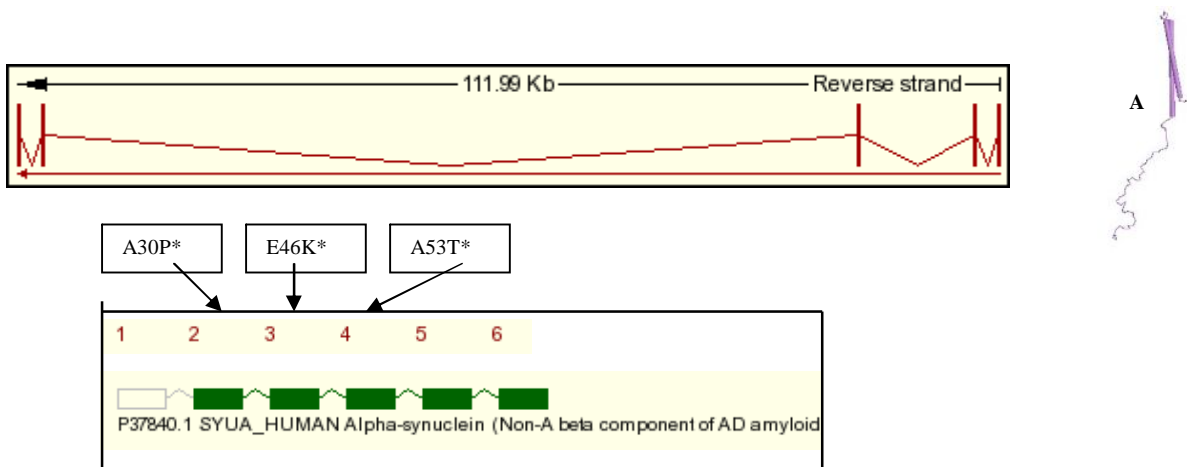
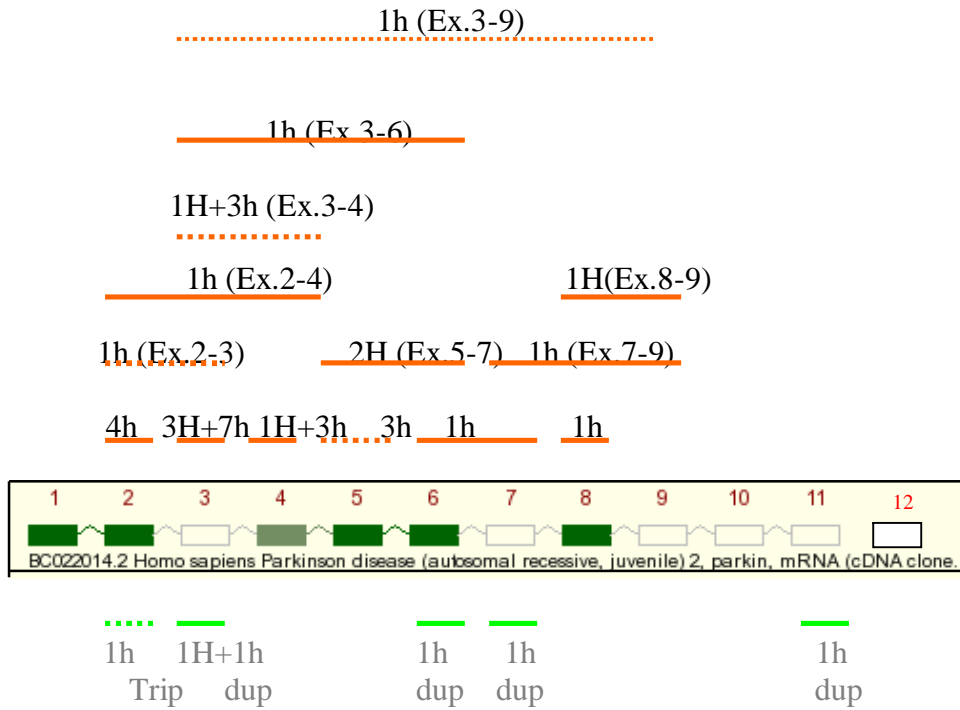


Figura 1. Fuente: modificado de *Taiwán Polymorphic Database*. PARK 1. Mutaciones más frecuentes. Missense/nonsense*: sustitución de pares de bases en regiones codificantes. Otras: duplicaciones y triplicaciones del gen completo. A: Estructura tridimensional de la proteína (Fuente: *Gene card database*). SNCA. (Datos actualizados on-line en: <http://www.telefonica.net/web2/neuro-mancha> centro/Parkinson-Related-Mutations/).

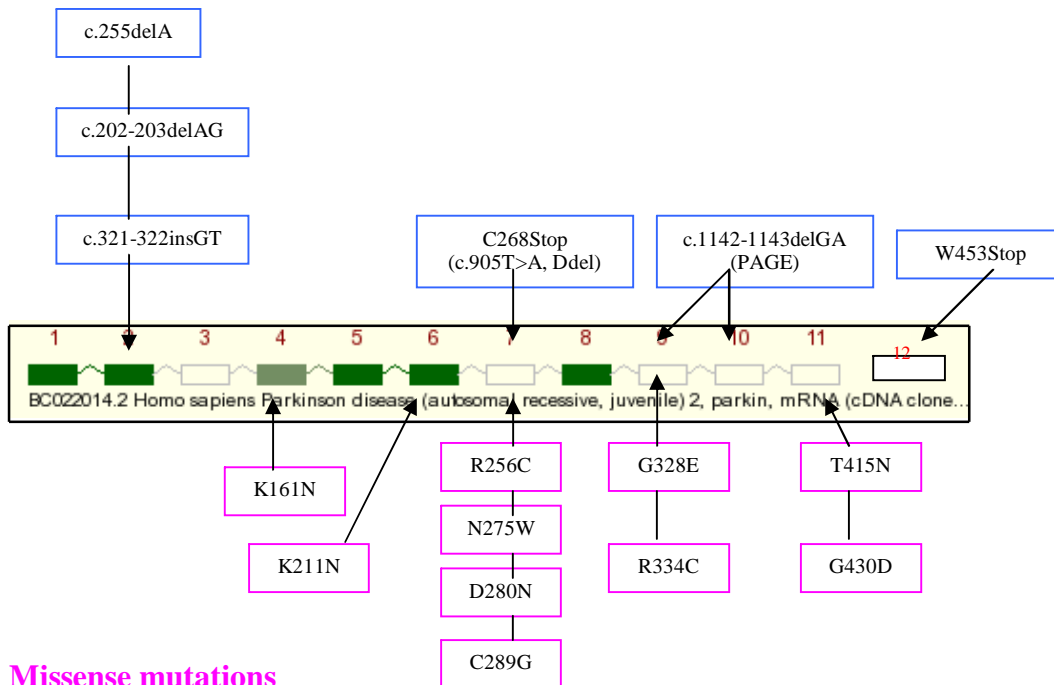
El segundo gen descrito en EP fue PARKIN (PARK 2, OMIM, #600116), hallado en familias Japonesas con un patrón de herencia autosómico recesivo. PARKIN es el segundo gen más grande conocido, de 1.3 Mb y contiene 12 exones (ver figura 2). Se han descrito más de 100 mutaciones, que incluyen deleciones, inserciones y mutaciones puntuales (Matsumine et al., 1997). Las manifestaciones clínicas en estos pacientes acontecen precozmente, en torno a los 20 años de edad, aunque se han descrito casos de inicio a los 6 años y posterior a los 40 años. El curso evolutivo de la enfermedad es lento e insidioso, con buena respuesta al tratamiento con L-dopa, aunque con frecuentes discinesias asociadas. Los hallazgos patológicos en necropsias muestran pérdida de neuronas en la *substantia nigra* con ausencia de CL (Mori, 2005;Takahashi et al., 1994). En cambio, las formas heterocigotas que han sido sometidos a estudios post-mortem, sí han mostrado cuerpos de Lewy (Farrer et al., 2001a;van de Warrenburg et al., 2001). Las mutaciones del gen PARKIN constituían en un principio aproximadamente un 49% del total de casos familiares de inicio precoz y un 18% de los esporádicos de inicio precoz. Hoy en día sabemos que esa cifra es inferior, siendo de un 13-15.4% (formas homocigotas) de los casos familiares y un 8,3% de los esporádicos, según estudios recientes (Clark et al., 2006). El papel de las mutaciones heterocigotas en este gen como factores de riesgo para la EP todavía no está claro, dados los resultados contradictorios (Hilker et al., 2001). Algunos autores consideran que juegan un papel en la edad de inicio de la enfermedad (Sun et al., 2006).

Delecciones



Multiplicaciones

Truncating mutations

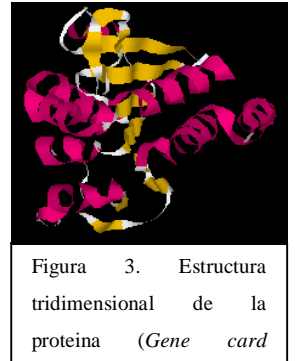


Missense mutations

Figura 2. Fuente: modificado de *Taiwán Polymorphic Database*. Mutaciones PARKIN. H: homocigoto, h: heterocigoto. Ex. Exón. A: Estructura tridimensional de la proteína (Fuente: *Gene card database*). PARKIN. Datos actualizados *on-line* en: <http://www.telefonica.net/web2/neuro-mancha> centro/Parkinson-Related-Mutations/).

El llamado PARK 3 (OMIM, #602404) fue descrito en familias alemanas y danesas con diagnóstico de EP, en las que se halló un ligamiento al cromosoma 2p13. Sin embargo, el gen responsable no se conoce en el momento actual. Estudios de haplotipos confieren una penetrancia de hasta un 40% para ese gen.

PARK 5 (OMIM, #191342) fue identificado al secuenciar 72 familias con EP. Se describió inicialmente una mutación *missense* (I93M) en dos familias alemanas en el gen que codifica la ubiquitina carboxiterminal hidrolasa L1 (UCHL1, 4p14) (ver figura 3). Se trata de un gen candidato que participa en la vía de degradación proteica a través de la ruta de la ubiquitinización. Desde el punto de vista clínico, la familia está compuesta por dos miembros con EP de inicio entre 49-51 años, con un curso clínico similar a las formas esporádicas, incluyendo una buena respuesta a L-dopa. La mutación es la 193M y provoca una reducción de la actividad enzimática de la proteína de un 50%. No se han encontrado otras familias con esta mutación, aunque sí se ha descrito un polimorfismo (S18Y) que se relaciona de forma inversa con la EP de una forma dosis-dependiente (Maraganore et al., 1999).



PARK 6 (OMIM, #605909) y 7 (OMIM, #606324) se identificaron en dos familias europeas con un patrón de herencia autosómico recesivo, y los loci a los que corresponden se sitúan en el cromosoma 1p36 con sólo 25 cM de distancia entre ellos. Respecto al PARK 6 (ver figura 4), se encontraron dos mutaciones diferentes en homocigosidad que afectaban a PTEN-induced putative kinase 1, o PINK 1 kinasa (PINK 1, 1p35-36). También se han hallado en familias con origen en Asia y Norteamérica (Hatano et al., 2004), y raros casos esporádicos de precoz. En concreto, los estudios efectuados a estos individuos han mostrado un número no desdeñable de portadores de mutaciones heterocigotas (Rogaeva et al., 2004;Valente et al., 2004b). Aunque este fenómeno ha sido descrito en controles sanos, los estudios realizados posteriormente apuntan a que los heterocigotos para PINK1 podrían corresponder a formas fenotípicas de lenta progresión. Es más, estudios de neuroimagen funcional han revelado un hipometabolismo de la dopamina en estos individuos (Khan et al., 2002). Deben realizarse más estudios en esta línea para corroborar esta hipótesis.

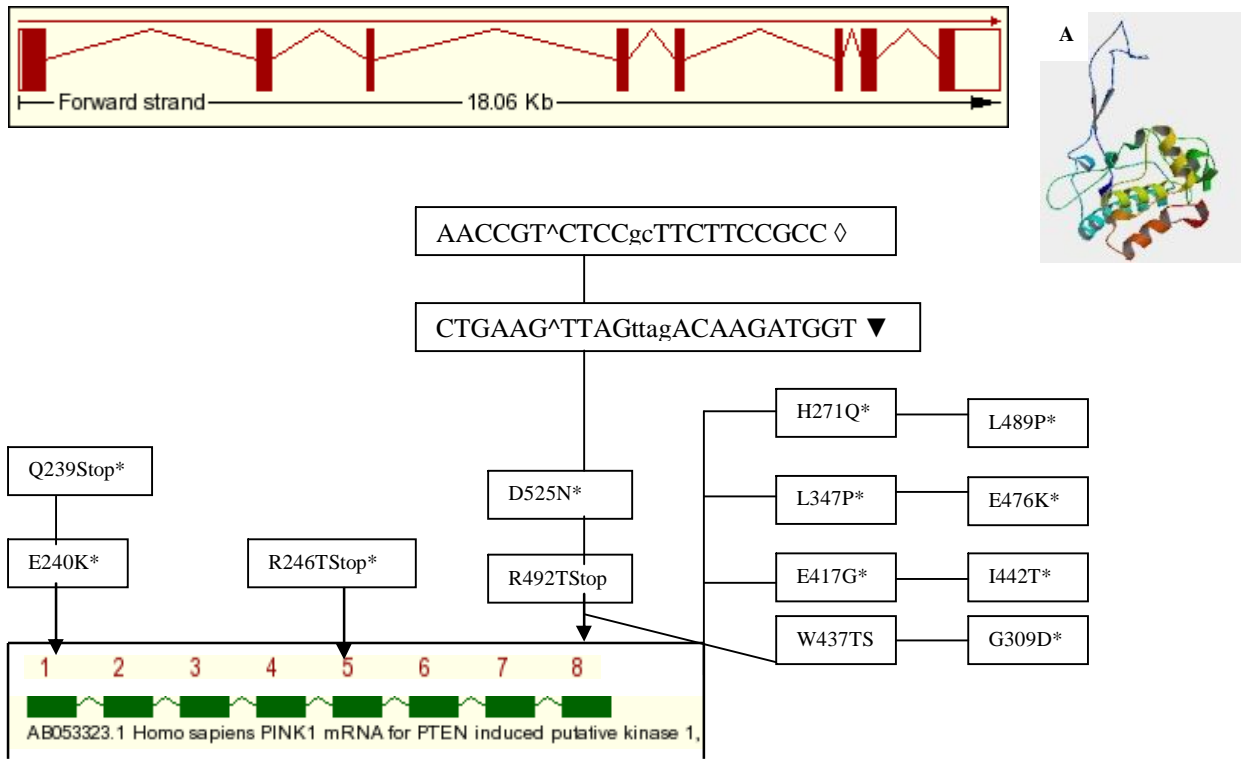


Figura 4. Fuente: modificado *The Taiwán Polymorphic Database*. PARK 6. Mutaciones más frecuentes. (*)Missense/nonsense; (▼)Small insertions; (◇)Small indels. A: Estructura tridimensional de la proteína (Fuente: *Gene card database*). PINK1. (Datos actualizados *on-line* en: <http://www.telefonica.net/web2/neuro-mancha-centro/Parkinson-Related-Mutations/>).

El gen responsable del PARK 7, es el DJ-1 (Nagakubo et al., 1997), donde se han hallado una deleción en el exon 5 o mutaciones puntuales P166L (Bonifati et al., 2003) (ver figura 5).

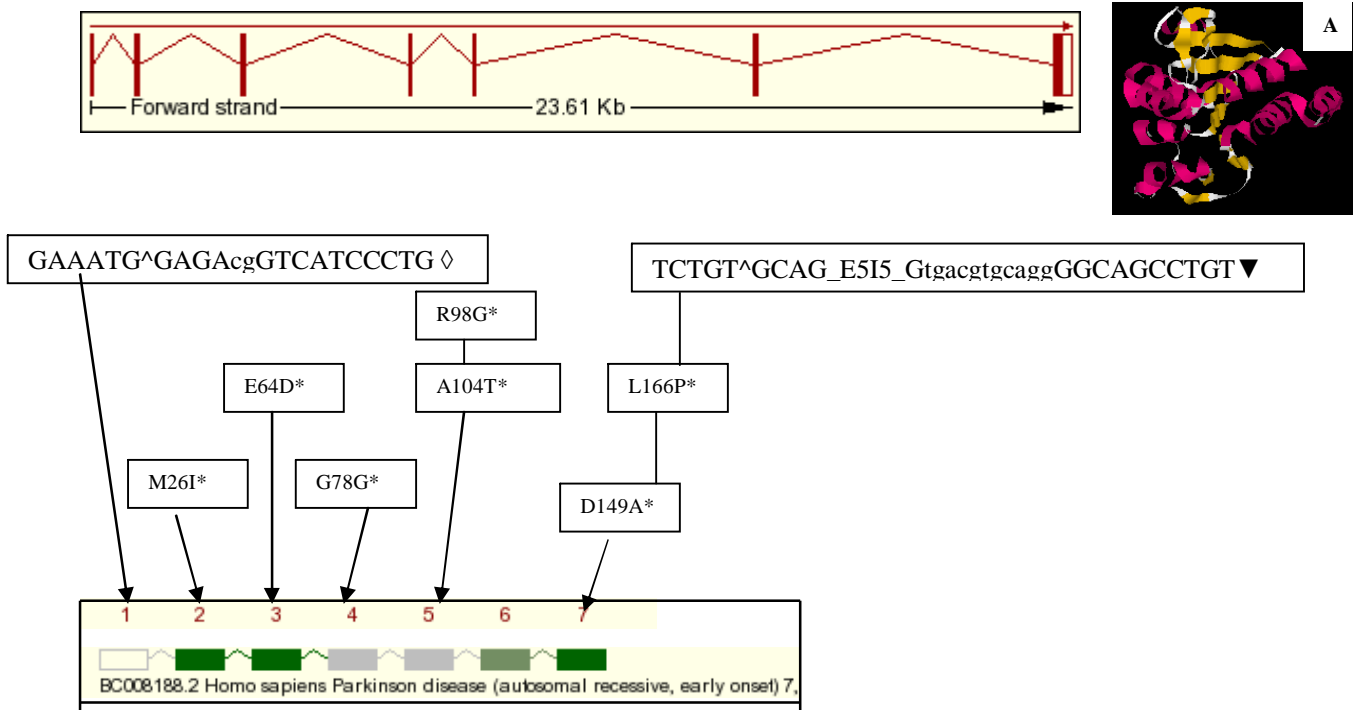


Figura 5. Fuente: modificado de *Taiwán Polymorphic Database*. PARK 7. Mutaciones más frecuentes. (*)Missense/nonsense; (▼)Small deletions; (◊)Small indels. A: Estructura tridimensional de la proteína (Fuente: *Gene card database*). DJ-1. (Datos actualizados *on-line* en: <http://www.telefonica.net/web2/neuro-mancha-centro/Parkinson-Related-Mutations/>).

PARK 8 (OMIM, #607060) fue descrito en una familia japonesa (*The Sagamihara Kindred*) con una EP de inicio juvenil. Posteriormente se constató que se trataba de casos secundarios a mutaciones en el gen que codifica la *leucine-rich repeat kinase 2* (LRRK2, 12q12), también llamada "dardarina" (Zimprich et al., 2004a). Se han descrito siete mutaciones (K1114K; I1122V; R1441C; R1441G; Y1699C; I2020T y G2019S) en las que se ha demostrado segregación del gen causal, pero existen más de 20 mutaciones puntuales descritas en casos únicos y que todavía no se conoce su patogenicidad (ver figura 6). El término "dardarina" es de origen vasco y hace referencia a un temblor prominente como manifestación clínica principal de una familia vasca donde se describió inicialmente la mutación. La enfermedad se hereda de forma autosómico dominante, con un amplio rango de edad de inicio (34-73 años), así como una lenta progresión. Desde un punto de vista epidemiológico, se trata probablemente de uno de los genes más importantes, ya que su mutación más frecuente G2019S (ver figura 6) se ha descrito en un 41% en el Norte de Africa, y en un 2.1-11% de familias europeas, con un gradiente Norte-Sur. Además, se

ha encontrado en un 2-8% de esporádicos con un inicio tardío (Farrer et al., 2005;Foroud, 2005). Se cree que aunque no siempre se asocie a EP familiar es posible que exista un efecto fundador ancestral común (Kachergus et al., 2005).

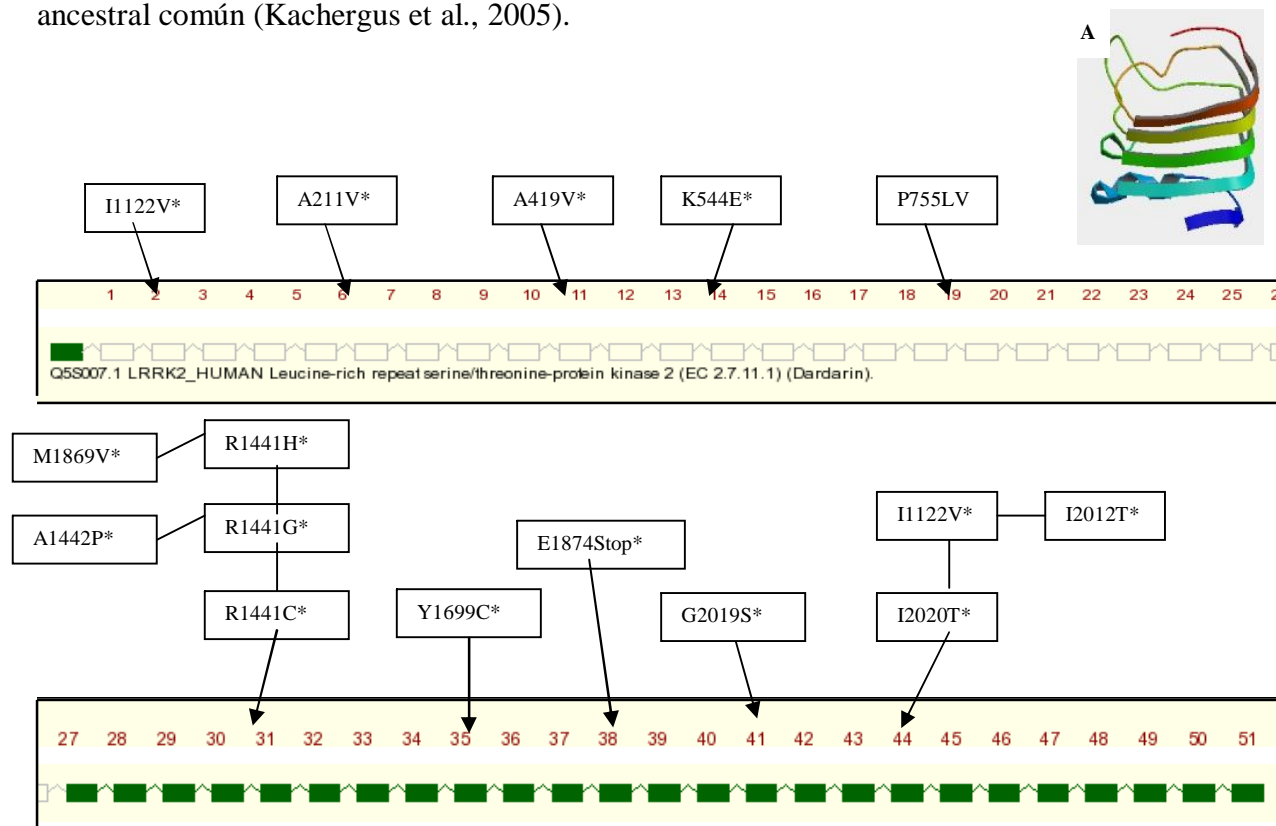


Figura 6. Fuente: modificado de *Taiwán Polymorphic Database*. PARK 8. Mutaciones más frecuentes. (*)Missense/nonsense. A: Estructura tridimensional de la proteína (Fuente: *Gene card database*). LRRK2. (Datos actualizados on-line en: <http://www.telefonica.net/web2/neuro-mancha> centro/Parkinson-Related-Mutations/).

La penetrancia de estas mutaciones es edad-dependiente y se sitúa como media en torno al 66%, (17% para la edad de 50 años y 85% para los 70 años).

PARK 9 (OMIM *610513) corresponde a un Parkinson de inicio muy precoz con espasticidad. Se ha mapeado la región 1p36 (Hampshire et al., 2001).

Tanto PARK 10 (OMIM 606852) (1p32) como PARK 11 (OMIM, 607688) (2q36) fueron encontrados en una búsqueda genómica en pares de hermanos con EP (Hicks et al., 2002).

El PARK 12 (OMIM 300557) se considera al ligamiento de algunas familias descritas en el PARK 11 al cromosoma Xq21 (Pankratz et al., 2003).

El PARK 13 (OMIM, [#610297](#)) es el último descrito. Mediante una aproximación a genes candidatos realizaron un screening de la mutación del gen Omi/HtrA2 (2p12) en 518 pacientes alemanes con EP. Identificaron en cuatro de ellos una nueva mutación en heterocigosidad G399S mutation, que no aparece en controles sanos (Strauss et al., 2005).

GEN	HERENCIA	LOCUS	PROTEINA	MUTACIONES	CLINICA	HISTOLOGIA	REFERENCIA
SNCA	AD	PARK1/4 (4q21)	Alfa-Sinucleína SNCA	Ala53thr(1) Ala30pro(2) Glu46lys(3) Duplicación(4) Triplicación(5)	(1)Inicio precoz, rápida progresión (2)EP típica (3)Deterioro cognitivo, alucinaciones (4)EP típico (5)Inicio precoz, rápida progresión, demencia, muerte precoz	Degeneración SN, CL en SN, cortex e hipocampo	<i>Polymeropoulos et al 1997</i>
PARKIN	AR	PARK2 (6q25-27)	Parkin	>100 (delecciones, inserciones, mutaciones puntuales)	Inicio precoz, similar a EPI, buena respuesta a L- dopa, discinesias precoces, fluctuaciones diurnas	Degeneración SN, CL. CL en portadores heterocigotos	<i>Kitada et al 1998</i>
?	AD	PARK3 (2p13)	?	?	EP típica	Degeneración SN con CL	<i>Gasser et al 1998</i>
UCH-L1	AD	PARK5 (4p14)	ubiquitina carboxi- terminal hidrolasa L1	Missense ile93met Polimorfismos ser18tyr	EP típica	?	<i>Leroy et al 1998</i>
PINK 1	AR	PARK6 (1p35-36)	PTEN- induced putative kinase 1	Truncating mutations Point mutations Deletions	Inicio precoz, respuesta a L-dopa, lenta progresión, discinesias	?	<i>Valente et al 2001, 2004</i>
DJ 1	AR	PARK7 (1p36)	DJ1	Deletions Point mutations	Inicio precoz, respuesta a L-dopa, distonía y alteraciones psiquiátricas	?	<i>van Duijn et al 2001</i>
LRRK2	AD	PARK8 (12q12)	leucine-rich repeat kinase 2 LRRK2	lys1114lys Ile1122val Arg1441cys Arg1441gly Tyr1699cys Ile2020thr Gly2019ser(>fr)	Respuesta a L-dopa, parálisis de la supravversión de la mirada, distonía, enfermedad de neurona motora, demencia	Degeneración SN, inclusiones ubiquitina positivas, enfermedad motoneurona	<i>Funayama et al 2002 Paisán-Ruiz et al 2004 Zimprich et al 2004</i>
?	?	PARK9 (1p36)	?	?	?	?	<i>Hampshire et al 2001</i>
?	?	PARK10 (1p32)	?	?	EP típica	?	<i>Hicks AA, et al., 2002; Pankratz N, et al., 2003</i>
?	?	PARK11 (2q36-37)	?	?	EP típica	?	<i>Hicks et al 2002 Pankratz et al 2003</i>
?	?	PARK12 (Xq21) PARK13 (2p12)	?	?	EP típica	?	<i>Pankratz N et al 2003</i>
HTRA2	?	PARK13 (2p12)	Serine/protease /HTRA2	G399S	EP típica	?	<i>Strauss et al, 2005</i>

TABLA 1: Genes implicados en la Enfermedad de Parkinson.

* <http://www.telefonica.net/web2/neuro-mancha> centro/Parkinson-Related-Mutations/.

3.5.PATOGENIA DE LA EP A TRAVES DE LOS GENES CONOCIDOS. PAPEL DE LA MITOCONDRIA.

Vamos a proceder a una breve revisión de los mecanismos fisiopatogénicos implicados en la EP tomando como punto de partida, la función o funciones que se han atribuido en la actualidad a las proteínas conocidas, que están codificadas por los genes descritos en las formas de EP con herencia Mendeliana.

Comenzaremos con la SNCA (ver figura 1), que fue la primera en descubrirse. Esta proteína se expresa a través de todo el SNC, fundamentalmente en las terminales sinápticas, membranas lipídicas y vesículas (Goedert, 2001;Solano et al., 2000). Su función se desconoce, pero se cree que podría jugar un papel en la neurotransmisión sináptica y plasticidad neuronal (Abeliovich et al., 2000). Un posible papel de esta proteína en la patogénesis de la enfermedad fue ya sugerido al ser el componente fundamental de los CL. Las tres sustituciones (A30P; A53T, E46K) alteran las propiedades de la proteína, y conducen a un incremento de la propensión de la misma a oligomerizarse y a agregarse (Choi et al., 2004). La oligomerización de la SNCA produce especies intermedias (protofibrillas) que forman estructuras anulares con propiedades semejantes a los poros de las membranas, permitiendo su permeabilización (Lashuel et al., 2002;Li et al., 2001). Se ha sugerido que las protofibrillas son las especies tóxicas de la SNCA y las responsables de la muerte neuronal (Caughey and Lansbury, 2003). Los altos niveles de SNCA pobremente degradada tienen tendencia a agregarse y a inducir agregación en otras especies proteicas, interfiriendo con las funciones intracelulares e induciendo citotoxicidad (Bennett et al., 2005). Este proceso se cree que es crucial en la formación de los CL y por consiguiente en la patogénesis molecular de la enfermedad.

Siguiendo un orden cronológico, el siguiente gen descrito PARK2 codifica la proteína PARKIN (ver figura 2) que es miembro de la familia de las ubiquitin ligasas E3 responsables de la transferencia de moléculas de ubiquitina activadas al sustrato (Shimura et al., 2000). PARKIN es expresada en el citoplasma, núcleo, aparato de Golgi y procesos neuronales (Horowitz et al., 2003). La capacidad para ubiquitinar otras proteínas puede dañarse por S-nitrosilacion, que a su vez es consecuencia de la excito-toxicidad.Varios sustratos se han propuesto (Mata et al., 2004).

Existe alguna evidencia acerca de que la inhibición del sistema ubiquitina-proteosoma podría ser responsable de la degeneración de la vía nigroestriatal en la EP idiopática.

Respecto al PARK 5 (UCH-L1) (ver figura 3) se trata de una de las proteínas más abundantes del cerebro (Solano et al., 2000), constituyendo aproximadamente el 1-2% de todas las proteínas solubles del cerebro (Wilkinson et al., 1989; Wilkinson et al., 1992), y en estudios de inmunofluorescencia de CL se ha visto que son positivos para esta proteína (Lowe et al., 1988). Es una enzima que hidroliza el extremo C-terminal de la ubiquitina para generar monómeros de la misma que pueden ser reciclados para el aclaramiento de otras proteínas. Una mutación *missense* se identificó en dos hermanos pertenecientes a una familia alemana, demostrando que inducía una reducción de la actividad del enzima. No han sido descritos otros casos hasta la fecha (Harhangi et al., 1999; Lincoln et al., 1999).

El gen de la PTEN-induced kinase 1 (PINK 1) (ver figura 4) codifica una kinasa serina/treonina localizada en la mitocondria. Se conoce poco sobre la función de esta proteína, pero se ha sugerido que podría jugar un papel protector de las neuronas frente al stress inducido por la disfunción mitocondrial. Tanto el MPTP como la rotenona son dos toxinas ambientales que causan una degeneración selectiva de la vía nigro-estriatal por inhibición del Complejo I mitocondrial. En formas esporádicas de EP, la actividad de la vía de la fosforilación oxidativa, especialmente el Complejo I, se ha visto reducida (Dawson and Dawson, 2003).

La función de DJ-1 (ver figura 5) es desconocida, pero se trata de una proteína abundante en el cerebro, expresada fundamentalmente en los astrocitos. Su isoforma acídica se acumula después del stress oxidativo indicando que DJ-1 limita la toxicidad celular (Mitsumoto et al., 2001). Las condiciones oxidativas inducen una modificación de DJ-1, lo cual avala la hipótesis de que se trata de un sensor de stress oxidativo en las células (Canet-Aviles et al., 2004). Se localiza en la mitocondria, por todo ello, la afectación de esta organela es crucial en la patogénesis de la EP.

Finalmente LRRK2 (ver figura 6) es una proteína de gran tamaño (286 kDa) multifuncional, que parece ser expresada en la mayoría de las regiones cerebrales y muy abundante en la membrana externa de la mitocondria. Es un miembro de la recientemente definida familia ROCO (Bosgraaf and Van Haastert, 2003). Dentro de sus múltiples funciones se incluyen la unión a sustratos, fosforilación proteica e interacciones proteína-proteína. Las formas patogénicas más frecuentemente observadas en los dominios Roc y kinasa son las sustituciones, afectando los

codones R1441, G2019 e I2020. El dominio LRRK2 kinasa pertenece a la subfamilia de las kinasas MAPKKK. La función en condiciones fisiológicas de la proteína y los efectos de las diferentes mutaciones puntuales deben ser investigadas en estudios funcionales, cultivos celulares y otros modelos.

De los estudios epidemiológicos se ha deducido que la mitocondria está en el epicentro de la compleja ruta fisiopatogénica de la EP. La primera vez que se plantea su implicación en la génesis de la enfermedad fue en 1989, cuando el defecto en la actividad del Complejo I fue identificado en la *substantia nigra* de pacientes con EP (Schapira et al., 1989; Schapira et al., 1990). El defecto se cuantificó en aproximadamente un 35% de la actividad del Complejo I en la SN (Mann et al., 1994). Finalmente este defecto enzimático fue identificado en las mitocondrias de plaquetas de pacientes con EP (Haas et al., 1995; Krige et al., 1992; Parker, Jr. et al., 1989). Estas teorías se han corroborado gracias a la implicación de los genes descritos previamente (por ejemplo: PINK, DJ-1) así como las toxinas ambientales.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

4. OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

1. La descripción del fenotipo de casos con EP hereditario no ligado los genes conocidos hasta la actualidad.
2. El estudio de estas familias mediante Análisis de Segregación Compleja (ASC) a fin de conocer el patrón de herencia, la frecuencia génica y la penetrancia del gen.
3. Valorar la utilidad de los microarrays de SNPs de alta densidad en el estudio genético de la enfermedad de Parkinson familiar de herencia compleja.

METODOS

5. METODOS.

5.1.RECLUTAMIENTO DE LAS FAMILIAS.

Las familias incluidas en este estudio provienen de las familias que han sido evaluadas en la Consulta de Neurogenética del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, desde 1990 hasta la actualidad. El origen administrativo de estos pacientes es múltiple. La mayoría son pacientes del Area de Salud del Hospital (Area 4), variando el número de pacientes atendidos en el área entre 350.000 a 460.000 desde 1990 hasta la 2007. Otras familias provienen de casos referidos a la consulta de Neurogenética provenientes de otras Areas de Salud, de cualquier punto de España. Una vez conocido la existencia de un probando que presentase las características para ser incluido en el estudio, para la inclusión de otros casos de la misma familia que fuesen de Areas de Salud diferente se contactó con los pacientes a través del neurólogo encargado del seguimiento de cada paciente en particular.

5.2.SELECCIÓN DE LOS PACIENTES Y ESTUDIO FENOTÍPICO.

Los pacientes fueron seleccionados en base a presentar enfermedad de Parkinson y al menos un familiar vivo afectado de esta enfermedad. Como criterios de diagnóstico de enfermedad de Parkinson se utilizaron los Criterios para el Diagnóstico de Enfermedad de Parkinson (Gelb et al., 1999) y los Criterios Diagnósticos del Banco de Cerebros de la Sociedad de la Enfermedad de Parkinson del Reino Unido (UK PDSBB) (ver apéndice), basados en la presencia de al menos dos de los tres signos cardinales (temblor, rigidez o acinesia) durante el período del estudio, así como la ausencia de signos o síntomas de parkinsonismo atípico o secundario a otras etiologías. La edad de inicio se definió como la edad a la que el individuo comenzaba a referir síntomas neurológicos, por ejemplo temblor de reposo. Los datos a cerca de sintomatología neurológica en otros miembros de la familia que habían fallecido fueron obtenidos de los familiares vivos.

Todos los casos incluidos fueron revisados clínicamente por los autores del estudio. Además se realizaron analíticas sanguíneas que incluían estudio tiroideo, ceruloplasmina y cobre sérico. Otras exploraciones complementarias se han realizado de forma no sistemática como TAC,

RM craneal o estudio de función dopaminérgica mediante radiotrazadores (Dat-scan e IBZ). Para el estudio con iodine-123-betaIoflupane SPECT (Datscan®, GE) (Catafau and Tolosa, 2004), los pacientes recibieron una única inyección intravenosa de 123I-Ioflupano (111-185 MBq DaTSCAN, Amersham Health, Buckinghamshire, UK) y cuatro horas más tarde se realizó un SPECT. Además de este procedimiento, se determinó la densidad de receptores D₂ dopaminérgicos postsinápticos mediante 123I-iodobenzamida (IBZM) SPECT. Estos estudios se realizaron después de estar al menos 24 horas sin tomar medicación (levodopa o agonistas).

Dentro de este estudio se promovió la donación del cerebro al fallecer el paciente. Se realizó un estudio necrópsico ayudado por el programa de donación de cerebros del BTIN de Madrid. Se realizó autopsia completa de un caso, procediendo a la extracción del encéfalo en el Hospital Gregorio Marañón, que fue remitido a la Fundación Hospital Alcorcón, Programa de Neuropatología. Se obtuvieron bloques de tejido de hemisferio derecho (lóbulos frontal y parietal) para archivo a largo plazo en congelación a -80°C. Se realizó un examen externo del cerebro, así como de los cortes seriados coronales de ambos hemisferios cerebrales, cortes seriados transversales de tronco cerebral y axiales de cerebelo. A nivel microscópico se realizó tinción de hematoxilina-eosina en todos los bloques, y tinción de plata metenamina modificada, Gallyas, tau y α -sinucleína en bloques seleccionados. Las áreas estudiadas correspondieron a neocórtex asociativo según áreas CERAD, córtex singular, insular, córtex motor primario, corteza calcarina, hipocampo, núcleo estriado, globo pálido, núcleo basalis de Meynert, sustancia nigra, hipotálamo, núcleos talámicos, núcleos subtalámicos, locus coeruleus, bulbo y cerebelo.

5.3.CONSIDERACIONES ETICAS DEL ESTUDIO.

El estudio ha sido aprobado por el Comité Etico del Hospital Ramón y Cajal de Madrid (ver apéndice).

5.4.ANALISIS DE SEGREGACION COMPLEJA. “POINTER SOFTWARE”.

Para el análisis de segregación compleja se utilizó el programa informático “Pointer” en su versión para el sistema operativo MSDOS, analizando ocho modelos de herencia: no transmisibilidad, multifactorial, mendeliano dominante, recesivo, codominante, poligenico, mixto y general. Estos modelos se compararon mediante el examen de la diferencia en la *likelihood-ratio*

$(-2\ln(L))$ de cada modelo, que se ajusta a una χ^2 con grados de libertad igual a la diferencia en el número de parámetros estimados o no en cada modelo.

Los parámetros del modelo son:

- q, la frecuencia del alelo de alto riesgo A;
- t, las desviaciones típicas de desplazamiento en locus mayor simple entre los dos homocigotos;
- d, el grado de dominancia del locus mayor simple, cuando $d=0$ corresponde a un gen recesivo, cuando $d=1$ corresponde a un gen dominante, cuando $0 < d < 1$ corresponde a algún grado de aditividad, si $d=0.5$ el gen es codominante;
- H, la heredabilidad poligénica en la descendencia;
- Z, la razón de heredabilidad intergeneracional (adulto a niño);
- t_1 , t_2 y t_3 , las probabilidades de que los genotipos AA, Aa, aa transmitan el alelo A, respectivamente, o probabilidades de Elston. Por ejemplo, si el locus mayor simple tiene herencia mendeliana, entonces $t_1=1$, $t_2=0.5$ y $t_3=0$; si las t son iguales no hay transmisión de un efecto Mendeliano. Cuando se itera t_2 se pueden producir alteraciones significativas con relación al modelo que lo tiene restringido. Si la variación significativa entre los valores de los t_2 tiende a ser menor de 0.5 significa que se pueden estar presentando interacciones epistáticas del gen Mendeliano; por el contrario, si las variaciones estadísticamente significantes que se observan en t_2 muestran un incremento en la estimación hacia valores mayores

Bajo el modelo unificado para el ASC se debe formular la siguiente hipótesis para definir la existencia de un gen Mendeliano:

- Rechazar la hipótesis de un no efecto Mendeliano.
- Rechazar la hipótesis de no transmisión del gen Mendeliano.
- Fracasar al rechazar la hipótesis de una transmisión Mendeliana.

Tal y como se mencionó anteriormente (ver Introducción), los modelos son comparados mediante las *likelihood ratio* o razón de verosimilitud. La diferencia entre menos dos veces el logaritmo de la *likelihood* más una constante $(-2\ln L+k)$ calculado bajo el modelo general (con m parámetros) y bajo el modelo reducido (con n parámetros) es asintóticamente distribuido mediante una χ^2 con $m-n$ grados de libertad. Otra forma de comparar hipótesis es usando el criterio de Akaike (*Akaike information criterion: AIC*) (Akaike HA, 1974). AIC es calculado mediante $-2\ln L+k$ más dos veces el número de parámetros libres en el modelo. El modelo con el AIC más

bajo es el más se ajusta a los datos. Tiene como ventaja que un modelo no tiene porqué ser subsidiario de otro y por tanto puede ser usado para modelos no analizados.

En caso de ajustarse al modelo Mendeliano es posible predecir el patrón de herencia del gen hipotético, la penetrancia y la frecuencia alélica. Tomando en consideración la tasa de mortalidad edad específica (Iselius et al., 1991), la penetrancia en los portadores del gen (G') como la incidencia acumulada aproximada para los portadores del gen en la j th liability class, nos da la siguiente fórmula:

$$P_j = P(\text{aff} | G', j) + [1 - P(\text{aff} | G', j)] M'_{j-1}$$

donde la mortalidad específica del genotipo es,

$$M'_{j-1} = \{ \Sigma P(G' | \text{aff}, i) (M_i - M_{i-1}) \} / \Sigma P(P' | \text{aff}, i) (I_i - I_{i-1})$$

5.5. ESTUDIOS GENÉTICO MOLECULARES

Los estudios genéticos moleculares efectuados fueron:

- 1) exclusión de genes recesivos descritos hasta la fecha (PARKIN, DJ-1 y PINK1);
- 2) exclusión de la presencia de mutaciones en el gen α -sinucleína;
- 3) examen de la mutación común G2010S del gen LRRK2;
- 4) examen mediante microarray de alta densidad de SNPs de la existencia de zonas comunes entre afectados, en aquellas familias que presentaban una estructura genética que permitiera dicho examen y estudio de CNV.

5.5.1. EXTRACCIÓN DE DNA.

El ADN total fue extraído de la sangre de los pacientes con el QIAamp DNA Blood Maxi Kit, QIAGEN, Hilden, Germany. Se parte de 2 ml de sangre en EDTA en un tubo de 15 ml. Se añade 200 μ l de Proteinasa K a cada muestra de sangre. Posteriormente se añade 2.4 ml de buffer AL y se mantiene en baño de agua a 70 °C durante 10 minutos. Se añade 2 ml de etanol 96-100%, se introduce cada muestra en tubos con columna y se centrifuga 3 minutos a 3000 rpm, 25°C. Se añade 2 ml de buffer AW1 y se centrifuga 1 minuto en las mismas condiciones previas. Se añade 2 ml de buffer AW2 y se vuelve a centrifugar 15 minutos. Finalmente se inserta la columna en un

tubo estéril y se añade en ella 300 µl de buffer AE y se centrifuga 5 minutos. Este paso se realiza dos veces y se obtiene aproximadamente 30 µg de ADN en 600 µl de Buffer AE.

5.5.2. EXCLUSIÓN DE GENES RECESIVOS YA DESCRITOS.

La exclusión de la causalidad de genes recesivos ya descritos (PARKIN, DJ-1, PINK1) se realizó mediante exclusión de la presencia de homocigosidad en marcadores polimórficos (STR) que flanquean dichos genes. Estos marcadores se seleccionaron de la “*Taiwan Polymorphic Database*”, http://tpmd.nhri.org.tw/php-bin/index_en.php. Dichos marcadores fueron amplificados mediante una Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).

Para el PARK 2 (PARKIN) seleccionamos los marcadores D6S1035F y D6S980F (ver figura 7), para el PARK 7 (DJ1) D1S548F y D1S1612 (ver figura 8) y para el PARK 6 (PINK1) D1S1571F y D1S478F (ver figura 9).

Los primers utilizados y las **condiciones de la PCR** se detallan en la tabla 2.

Protocolo de PCR: 71 µl de agua destilada, 10µl de PCR reaction buffer 10x+Mg, 6µl de dNTP a 2.5mM, 4 µl de primer a 10 pmol/µl, 8µl de ADN a 0.2 µg/µl y 2.5 U de Taq DNA polimerasa a 5 U/µl (Perkin Elmer, Indianapolis IN, USA).

El producto de PCR se examinó en gel de poliacrilamida (5.3 ml de acrilamida al 30%, 1 ml de TBE, 4.7 ml de agua destilada, 70 µl de persulfato amónico y 7 µl de TEMED) al 16%. Posteriormente se determinó el tamaño del producto de PCR en un secuenciador ABI342 en la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares de Madrid. La homocigosidad para una mutación en un gen candidato se excluye cuando el resultado de los marcadores que flanquean el gen es la heterocigosidad.

Los tamaños se comparan con los de la base de datos GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/).

GEN	Oligo Nombre	3' Modificacion	5' Modificacion	T°C Anillamiento*	Secuencia 5'-3'
PARKIN	D6S1035F	Unmodified	Unmodified	55-58°C	ACTTGAATCCAGGCATTCAG
PARKIN	D6S980F	Unmodified	Unmodified	55°C	AGGGAGCCGAGATTGCAC
DJ-1	D1S548F	Unmodified	Unmodified	55°C	GAACTCATTGGCAAAGGAA
DJ-1	D1S1612F	Unmodified	Unmodified	55-58°C	TCCCATGCCAAAATTCTTAG
PINK1	D1S1571F	Unmodified	Unmodified	55°C	CGGCAGCCTCTCAACA
PINK1	D1S478F	Unmodified	Unmodified	55°C	ATGCCCAATACCCAGT
PARKIN	D6D1035R	Unmodified	FAM	55-58°C	AAAACCTCAAGCTCAGAAAGGC
PARKIN	D6S980R	Unmodified	HEX	55°C	CTGAAGGGTGAGGAGTTTCT
DJ-1	D1S548R	Unmodified	FAM	55°C	GCCTCTTTGTTGCAAGTATT
DJ-1	D1S1612R	Unmodified	HEX	55-58°C	GAAAGAAAGAGAAAGAAGGAAGG
PINK1	D1S1571R	Unmodified	FAM	55°C	GCCACTCTCACCAGGGAG
PINK1	D1S478R	Unmodified	HEX	55°C	GCATTCATTTATTTCAGCAAGAT
SNCA	SYN3F	Unmodified	Unmodified	55-58°C	GCTAATCAGCAAATTTAAGGCTAG
SNCA	SYN4F	Unmodified	Unmodified	55-58°C	CGATGGCTAGTGGAAGTGG
SNCA	SYN5F	Unmodified	Unmodified	55-58°C	CGGAGGCATTGTGGAGTTTAG
SNCA	SYN6F	Unmodified	Unmodified	55-58°C	GACTGGGCACATTGGAAGTGG
LRRK2	LK41F	Unmodified	Unmodified	55°C	TTTTGATGCTTGACATAGTGGAC
LRRK2	LK41R	Unmodified	Unmodified	55°C	CACATCTGAGGTCAGTGGTTATC

TABLA 2: Primers y condiciones de PCR.

*PCR a 55°C: desnaturalización a 94°C (5 minutos), 35 ciclos a 94°C(30 segundos), seguido del anillamiento 55°C (30 segundos), elongación 72°C (45 segundos) con una extensión final a 72°C (5 minutos) y enfriamiento 24°C (10 minutos). PCR a 55-58°C: desnaturalización a 94°C (5 minutos), 6 ciclos a 94°C (30 segundos), seguido del anillamiento 58°C (30 segundos), y elongación 72°C (30 segundos). De nuevo, 32 ciclos a 94°C (30 segundos), 55°C (30 segundos),

5.5.3.EXCLUSIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN α -SINUCLEINA Y DE LA MUTACION COMUN LRRK2.

Para excluir mutaciones puntuales en el gen de la α -sinucleína se secuenciaron los 6 exones de este gen y el exón 41 de la LRRK2.

Los primers utilizados y las **condiciones de la PCR** se detallan en la tabla 2.

El producto de la PCR se examinó en gel de agarosa al 2% (0.60 g de agarosa, 0.6 ml de Buffer TAE (250 ml de agua destilada, 30.25 g de TRIZMA, 12.8 g de Borico, 0.92 g de EDTA, al 10%), y 30 ml de agua destilada) y posteriormente se purificó este producto mediante filtrado en columna “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega Corporation). Para ello, se añade la misma cantidad de Membrane Binding Solution al producto de PCR (en nuestro caso

40µl). La mezcla se inserta en una minicolumna. Se incuba a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifuga a 13.000 rpm 1 minuto. Se añade 700 µl de Membrane Wash Solution, centrifugado el producto a 13.000 rpm 1 minuto. Se vuelve a desechar el producto filtrado y se repite el paso previo pero con 500µl de Membrane Wash Solution y se centrifuga 5 minutos. Se deja reposar a temperatura ambiente durante 1-2 minutos y se transfiere la minicolumna a un tubo de 1.5 ml. Se añade 50 µl de Nuclease-Free Water a la minicolumna. Se centrifuga a 13.000 rpm 1 minuto y se deshecha la minicolumna quedándonos con el producto de PCR purificado en el tubo de 1.5 ml procediendo a almacenarlo en nevera a 4°C hasta su secuenciación que se realizó en un centro externo, enviándose en un tubo de PCR de 200 µl, 6 µl de producto de PCR a una concentración de 10 pmol/µl junto con 2 µl de primer forward a una concentración de 5 pmol/µl.

La secuencia obtenida se comparó con la secuencia almacenada en “*Taiwan Polymorphic Database*”, mediante el programa GeneRunner (www.generunner.com).

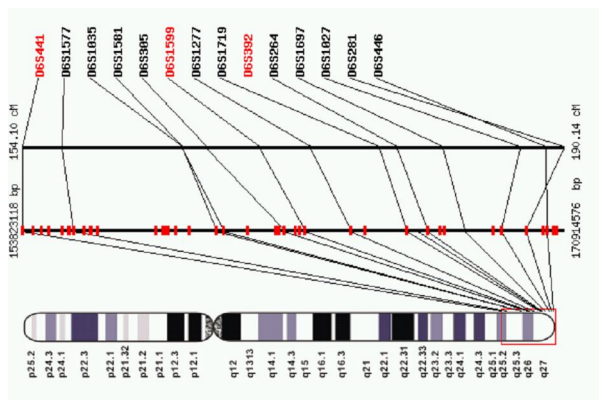
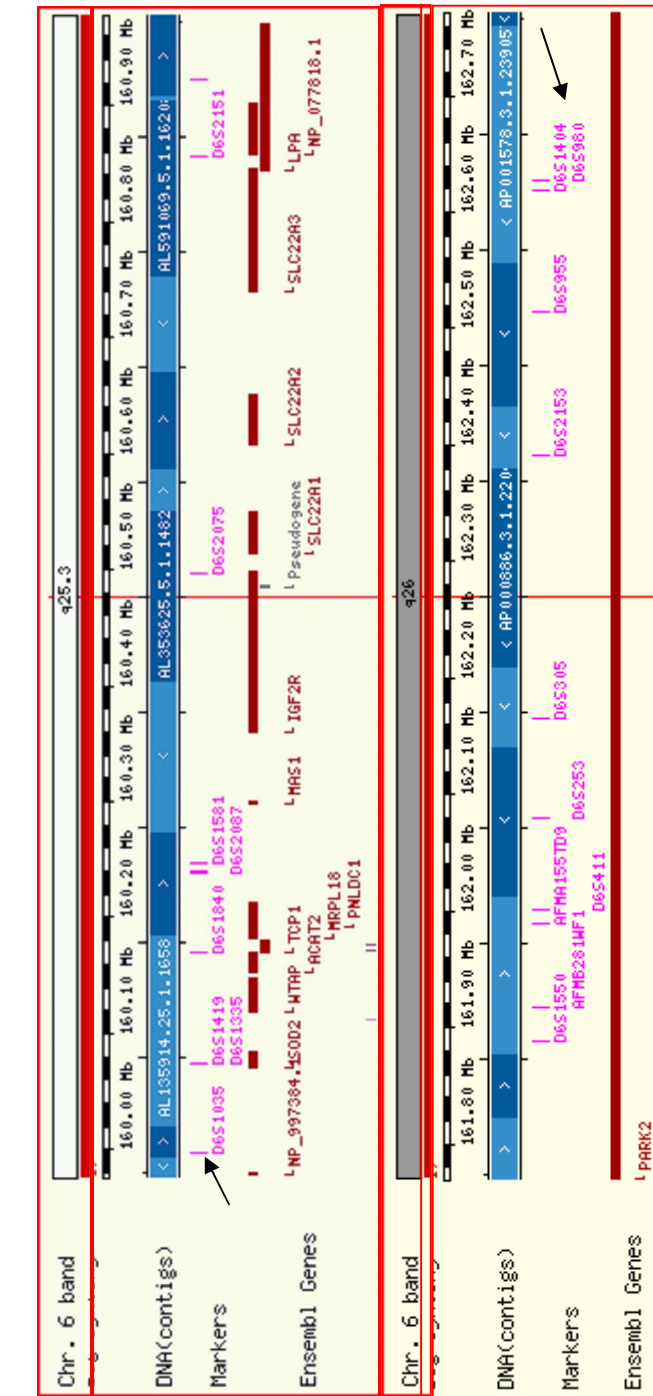



Figura 7. Cromosoma 6.

PARKIN.  Primers utilizados para el estudio de homocigosidad. Modificado de "Taiwan Polymorphic Database"

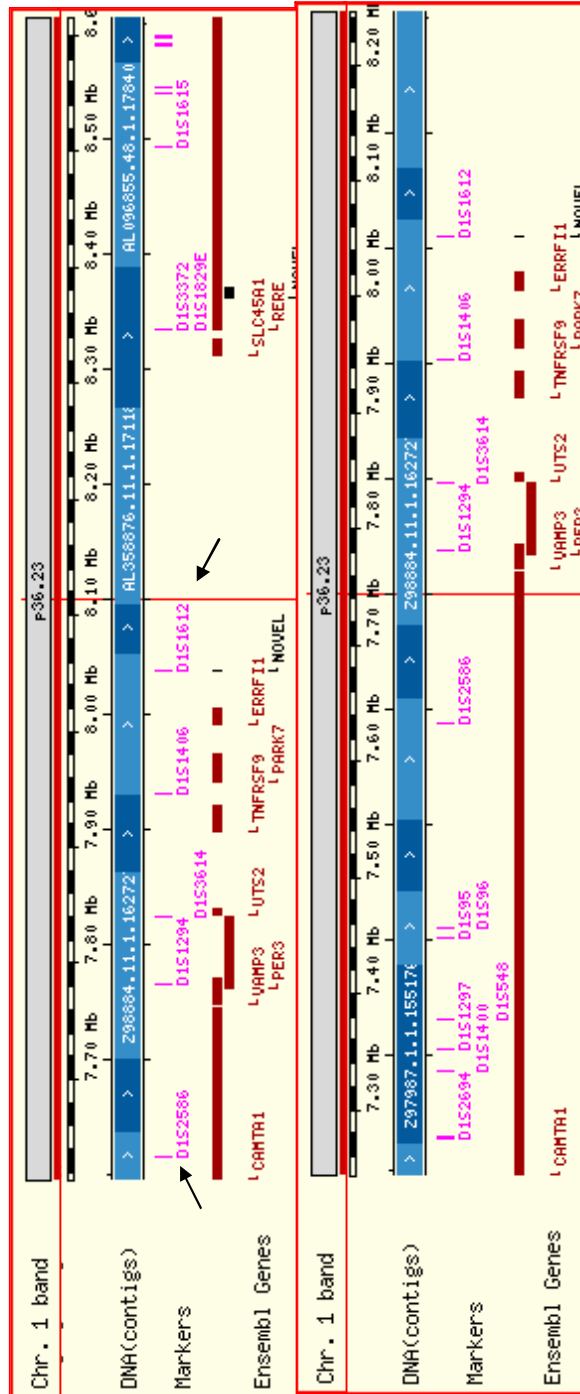
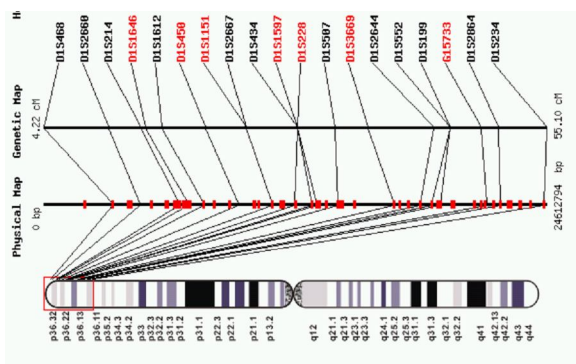


Figura 8. Cromosoma 1. DJ1.

Primers utilizados para el estudio de homocigosidad.
Fuente: Modificado de "Taiwan Polymorphic Database"

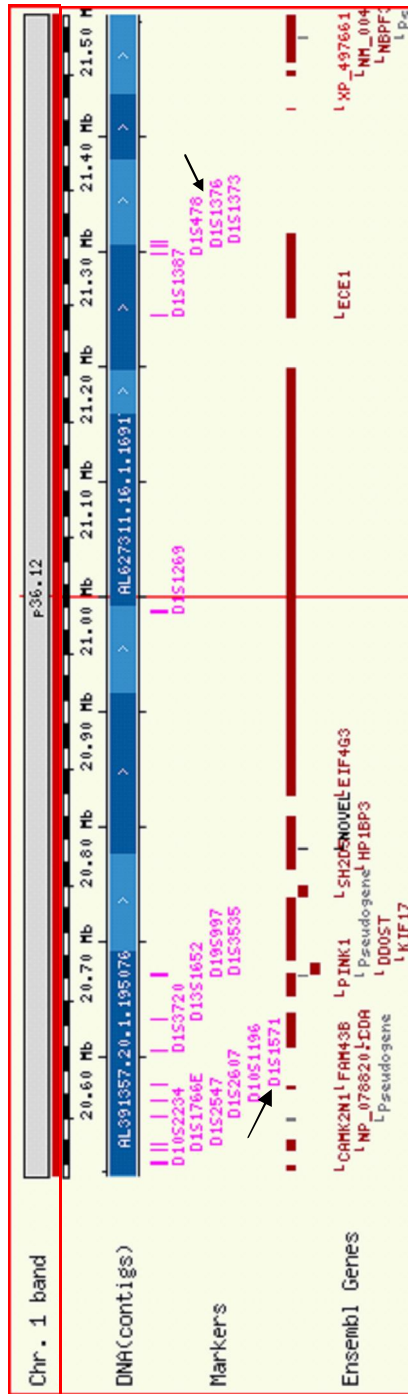

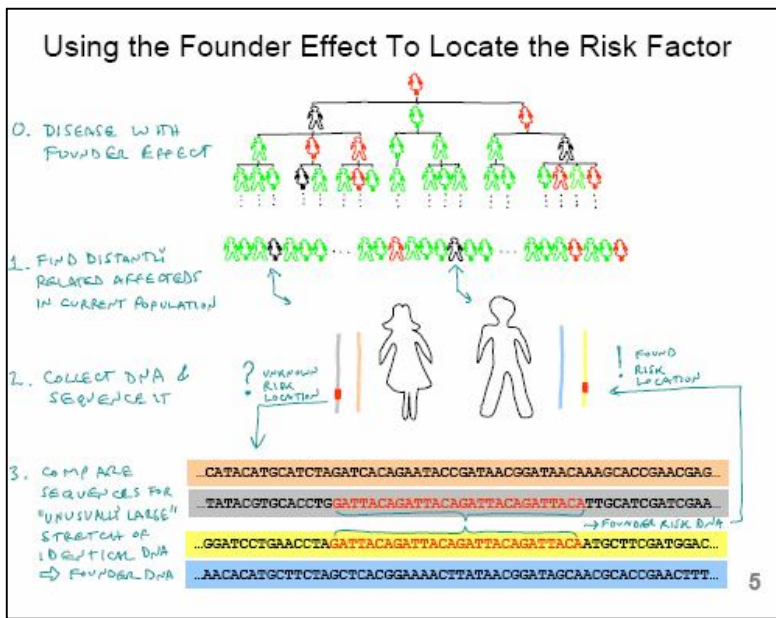


Figura 9 .Cromosoma 1.

PINK 1.  Primers utilizados para el estudio de homocigotidad. Fuente: Modificado de "TaiwanPolymorphic Database"

5.5.4. ESTUDIO DE LAS FAMILIAS CON ARRAYS DE ALTA DENSIDAD.

Los estudios con arrays de alta densidad de SNPs permiten el análisis de poblaciones aisladas (Bertoli-Avella et al., 2004; Dekker et al., 2003) con pocos afectos interrelacionados. Se basan en el “efecto fundador”, según el cual un ancestro portador del gen responsable de una enfermedad, en nuestro caso EP, transmite a la descendencia dicho gen, de tal manera que en cada generación posterior existirán portadores (50%, de forma esperable) que no desarrollen la enfermedad, así como no portadores que estarán libres, tanto del riesgo genético como de la enfermedad. Se podrá observar que algunos portadores pasarán al status de afectos (penetrancia). La estimación de dichos clusters de homocigosidad entre los individuos afectos descansa en que los ejemplos estudiados tengan una razonable homogeneidad, es decir, que su parecido genético no sea mayor del explicado simplemente por el azar (por IBS: *identity by state*) sino por descendencia (IBD: *identity by descent*) (Gibbs and Singleton, 2006). Para el estudio con el array de SNPs de



alta densidad se seleccionaron las familias 1-2 y 4, que cumplen perfectamente los requisitos descritos ya que se trata de familias con un patrón de herencia autonómica recesiva, y los individuos seleccionados guardan una relación de parentesco lejana, así como el efecto fundador en ellas.

El análisis genético mediante alta densidad de SNPs intentará detectar los fragmentos de ADN que corresponden a la “enfermedad heredada”. Empleamos un array

Figura 10: Efecto fundador. Fuente: Pedigree free-IBD mapping: using dense SNP information. Stanley F. Nelson MD.

Affymetrix de 500K (<http://www.affymetrix.com/products/arrays/index.affx>). El *GeneChip® Human Mapping 500K Array Set* ofrece la posibilidad de realizar estudios de asociación con la suficiente potencia en diferentes poblaciones.

El mapeo con 500K se compone de dos arrays, que en total incluyen más de medio millón de copias de oligonucleótidos de 25 pares de bases, sintetizados en paralelo, empleando

fotolitografía. Existen, en total, de 24 a 40 diferentes oligonucleótidos de 25 pares de bases por SNP. Cada array genotipa aproximadamente una media de 250.000 SNPs. Uno de los arrays emplea la enzima de restricción Nsp I (~262,000 SNPs), mientras que el segundo emplea la Sty I (~238.000 SNPs). Procedemos a la descripción del protocolo empleado para el estudio de hibridación. El total del genoma del individuo es digerido mediante una enzima de restricción (Nsp I o Sty I respectivamente) y ligado a adaptadores que reconocen estos fragmentos. La mediana de la distancia física entre SNPs es 2.5 Kb y la media de la distancia entre SNPs es 5.8 Kb. La media de heterocigosidad de esos SNPs es de 0.30. El 85% del genoma humano está en los 10 Kb de un SNP.

La figura 11 muestra el procedimiento seguido. Se emplea un primer genérico que reconoce a la secuencia del adaptador para así poder amplificar todo el genoma con un primer único. Las condiciones de PCR han sido previamente optimizadas para amplificar los fragmentos en el rango de tamaño de 200 a 1.100 pares de bases. El DNA amplificado es marcado e hibridado al *GeneChip* en un gel de agarosa. Una gran ventaja metodológica es que se requieren solo 250 ng de DNA para todo el proceso.

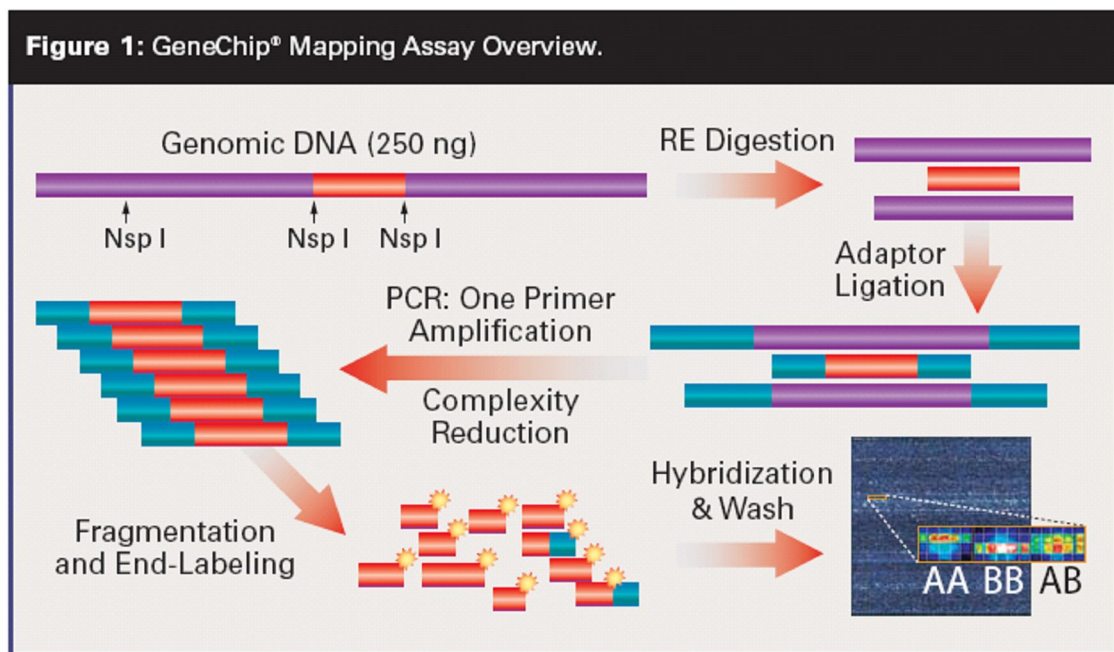


Figura 11. Resumen del método *GeneChip*® *Human Mapping*. Tomado de www.expressionanalysis.com/pdf/Affymetrix/GTHuman500K.pdf

El GeneChip Human Mapping 500K Array Set es usado en conjunto con el GeneChip® Genotyping Analysis Software (GTYPE), que a su vez emplea un algoritmo automatizado denominado *model-based genotype* que proporciona una puntuación fiable para cada genotipo individual. Este denominado *Dynamic Model algorithm* (DM) (Di et al., 2005), genera un ratio de hibridación mayor o igual al 93% (DM intervalo de confianza de 0,33) cuando se emplea DNA de buena calidad.

La hibridación del array se realizó en un servicio externo en *DNA VISION*, (Bélgica), (info@dnavision.be/ www.dnavision.be).

5.5.5. MAPEO DE HOMOZIGOSIDAD DE LAS REGIONES GENETICAS LIGADAS A LA ENFERMEDAD DE PARKINSON MEDIANTE UN ARRAY DE ALTA DENSIDAD DE SNP (500 K) CON EL PROGRAMA PLINK.

Los resultados del array fueron analizados empleando el software PLINK, que permite realizar un análisis de asociación de todo el genoma. Ha sido desarrollado por Shaun Purcell en el *Center for Human Genetic Research* (CHGR), Massachusetts General Hospital (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>). La primera versión data de Febrero 2006 y la más actual de Julio 2007. Existen versiones de este programa para sistema operativo Linux y para MSDOS. En el presente trabajo se empleó la versión 0.99s de Noviembre 2006 en sistema operativo MSDOS en entorno Windows XP. Se analizó la presencia de clusters de homocigosidad de gran tamaño compartidos por los individuos afectados. Los parametros específicos de ejecución del programa que se emplearon fueron (figura 11):

```
plink --noweb --file CHt1 --maf 0 --geno 1 --homozyg-snp 200 --mind 0.20 --homozyg-verbose --homozyg-het 4 --homozyg-group --homozyg-match 0.95.
```

-fileCHt1: archico específico .ped.

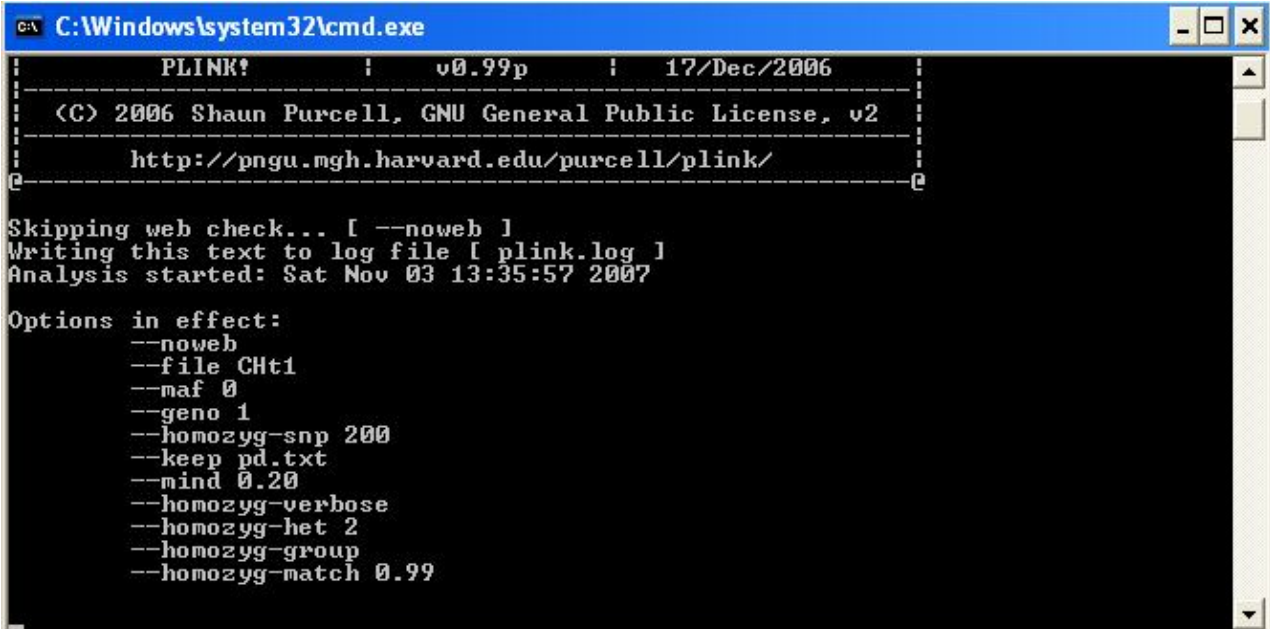
-homozyg snp: define el número de SNPs homocigotos repetidos a una cierta distancia en Kb.

-homozyg verbose: se añade al archivo plink.hom.overlap y analiza el genotipo actual de cada grupo (pool).

-homozyg-het 4: si se posee un gran número de SNPs en una muestra homogénea es posible calcular el coeficiente de inbreeding (basado en la observación frente al número esperado de genotipos homocigotos).

-homozyg-group: para obtener grupos de solapamiento y segmentos potencialmente similares, podemos utilizar *--homozyg-group* que generará un fichero nuevo.

-homozyg-match 0.95: grupo que contiene los segmentos de solapamiento que puede o no tener coincidencias alélicas. Para coincidencias alélicas, los segmentos son comparados en parejas y la coincidencia es aceptada si al menos existe un 0.95 de coincidencia, y ambos alelos son idénticos. Este punto de corte (umbral) puede ser cambiado.



```
C:\Windows\system32\cmd.exe
PLINK! | v0.99p | 17/Dec/2006
-----
(C) 2006 Shaun Purcell, GNU General Public License, v2
-----
http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/
-----
Skipping web check... [ --noweb ]
Writing this text to log file [ plink.log ]
Analysis started: Sat Nov 03 13:35:57 2007

Options in effect:
--noweb
--file CHt1
--maf 0
--geno 1
--homozyg-snp 200
--keep pd.txt
--mind 0.20
--homozyg-verbose
--homozyg-het 2
--homozyg-group
--homozyg-match 0.99
```

Figura 12. Ejecución del programa PLINK.

5.5.6. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD EN EL NUMERO DE COPIAS GENETICAS CON EL PROGRAMA CNAT (COPY NUMBER ANALYSIS TOOL).

El analisis de CNV se realizo mediante el software Affymetrix GeneChip® CNAT (*Copy number Analysis Tool*). Version 4.0. El CNAT es una herramienta del Affymetrix GeneChip® Genotyping Analysis (GTYPE) que permite realizar un análisis del número de copias y de la

pérdida de la heterozigosidad a partir de los datos de los Arrays de Affimetrix (500K, 100K y 10K).

El Affymetrix GeneChip® CNAT (*Copy number Analysis Tool*). Version 4.0. implementa un nuevo algoritmo para identificar las ganancias o pérdidas genómicas empleando arrays de alta densidad de SNPs. El CNAT 4.0 a su vez permite la visualización de los datos mediante una serie de gráficos generados automáticamente en el Affimetrix *Integrated Genomic Browser* (IGB) y almacenando dichos gráficos mediante el UCSC Browser.

Para instalar el Affymetrix GeneChip® CNAT (*Copy number Analysis Tool*). Version 4.0., inicialmente se debe instalar el Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS) y el Affymetrix GeneChip® Genotyping Análisis Software (GTYPE) en ese orden. GTYPE 4.1. contiene un nuevo algoritmo llamado BRLMM. Se recomienda que se emplee el GTYPE 4.1. para así poder crear ficheros BRLMM.CHP y analizar la pérdida de heterozigosidad.

El programa CNAT realiza un *Genomic Smoothing* o alisado que se refiere a la longitud medida en megabases que se usa en una ventana móvil para estimar el CNV. El CNAT 4.0 Batch Tool procesa los ficheros CHP generados a partir del GTYPE 4.1 usando cuatro tipos de análisis:

- CN para muestras pareadas
- CN para muestras no pareadas
- LOH para muestras pareadas
- LOH para muestras no pareadas

Escogimos para estimar el CNV el análisis no pareado.

La *Genomic Smoothing* que se emplea se denomina *gaussian smoothing*. El valor por defecto de la distancia es de 100 Kb (0.1 Mb), que supone un tamaño de ventana de 400 Kb. Si nos centramos en la metodología empleada en esta tesis, procedimos a realizar un análisis de las microdelecciones (<4 Mb), con una *Gaussian Smoothing* baja (0.01) y el resto de parámetros (desviación *standard*), transición, y *outliers* se mantuvieron en los parámetros que el programa aporta por defecto.

Dentro de las opciones comentadas al comienzo, una de ellas era la visualización del resultado del análisis del CNAT. Podemos obtener gráficos de todo el genoma o de algún

cromosoma en particular. Para ver el número de copias o la pérdida de heterocigosidad se ha de presionar el botón CNAT Viewer o seleccionar Run → CNAT Viewer en la barra del menú.

Para el examen de los resultados se utilizó la aplicación CNAT viewer (Affimetrix®), visualizándose los resultados cromosoma a cromosoma y posteriormente examinándose las regiones de interés.

RESULTADOS

6. RESULTADOS.

6.1. AGREGADOS FAMILIARES DE EP.

Familia 1 y 2: la familia representada en la figura 13, es originaria de un pueblo en la región de las Tierras Altas de Soria, geográficamente aislado, si bien sus componentes se encuentran dispersos entre Madrid y Cataluña. Los dos casos fueron sometidos a una exploración física completa y neurológica (escala de Hoehn and Yahr, ver tabla 3.), incluyendo el árbol genealógico. Su patrón de herencia es autosómico recesivo con un fundador común, considerando que de los tres afectos, dos son primos en la última generación y que los tres han nacido en la misma región, una zona aislada, montañosa y compartiendo el mismo apellido. Estos tres pacientes presentan una EP de lenta progresión (duración de la enfermedad comprendida entre 1-7 años), con buena respuesta a L-dopa. No muestran rasgos de parkinsonismo atípico como demencia precoz, signos piramidales, cerebelosos o disautonomía. No disponemos datos de anatomía patológica. El resultado de las pruebas complementarias efectuadas fue normal. El yoduro-123-betaIoflupane SPECT (Datscan®, GE) de los casos de la familia 1 III-1 (Figura 15) y la familia 2 III-3 (Figura 16) mostraron una captación bilateral aunque asimétrica en el putamen y núcleo caudado, demostrativo de lesión presináptica responsable del cuadro clínico.

La paciente III-5 fue video-filmada de acuerdo al protocolo *standard*.

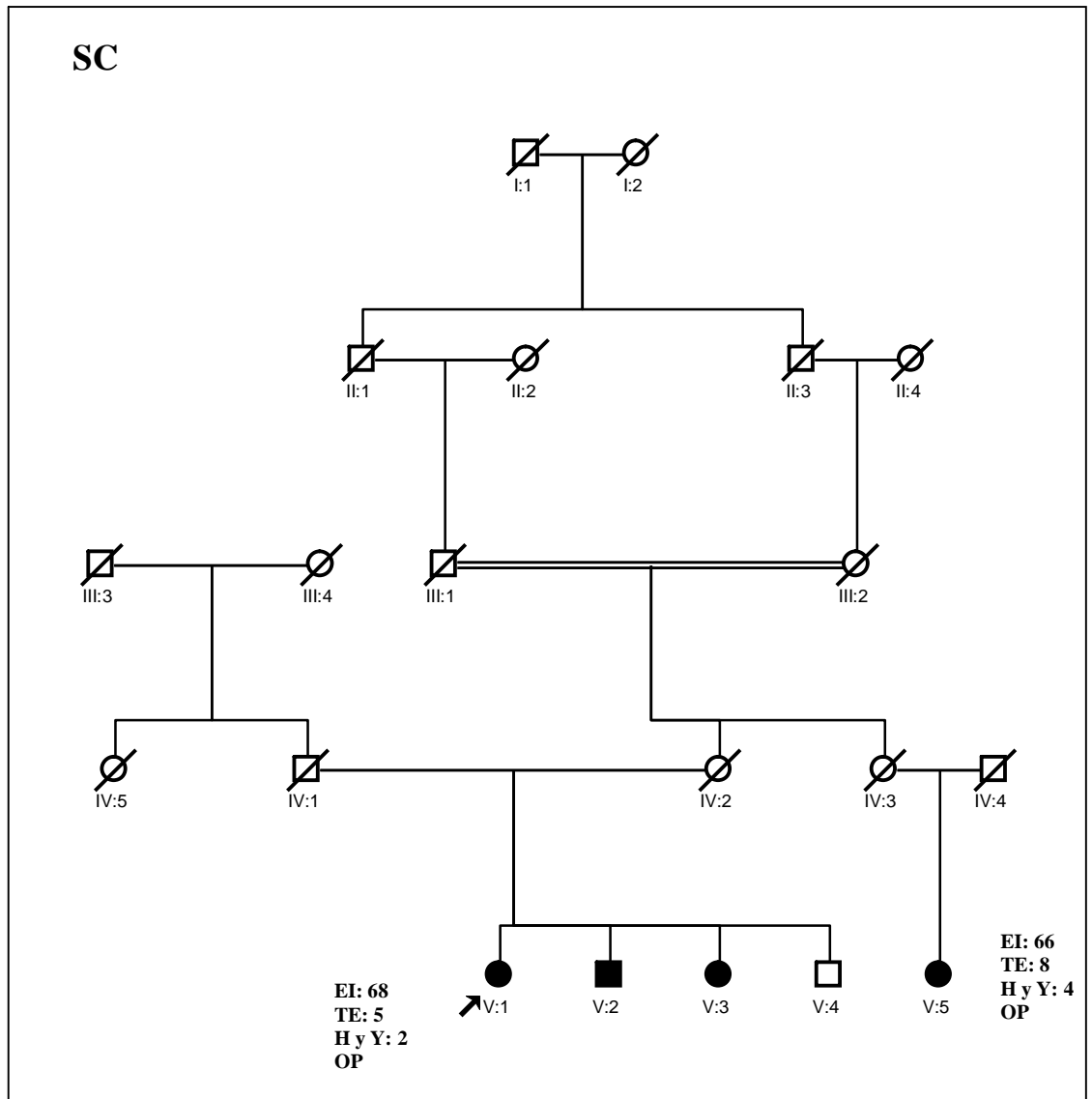


Figura 13. Arbol genealógico familia 1. EI: edad de inicio. TE: tiempo de evolución. H y Y: Hoehn y Yahr.

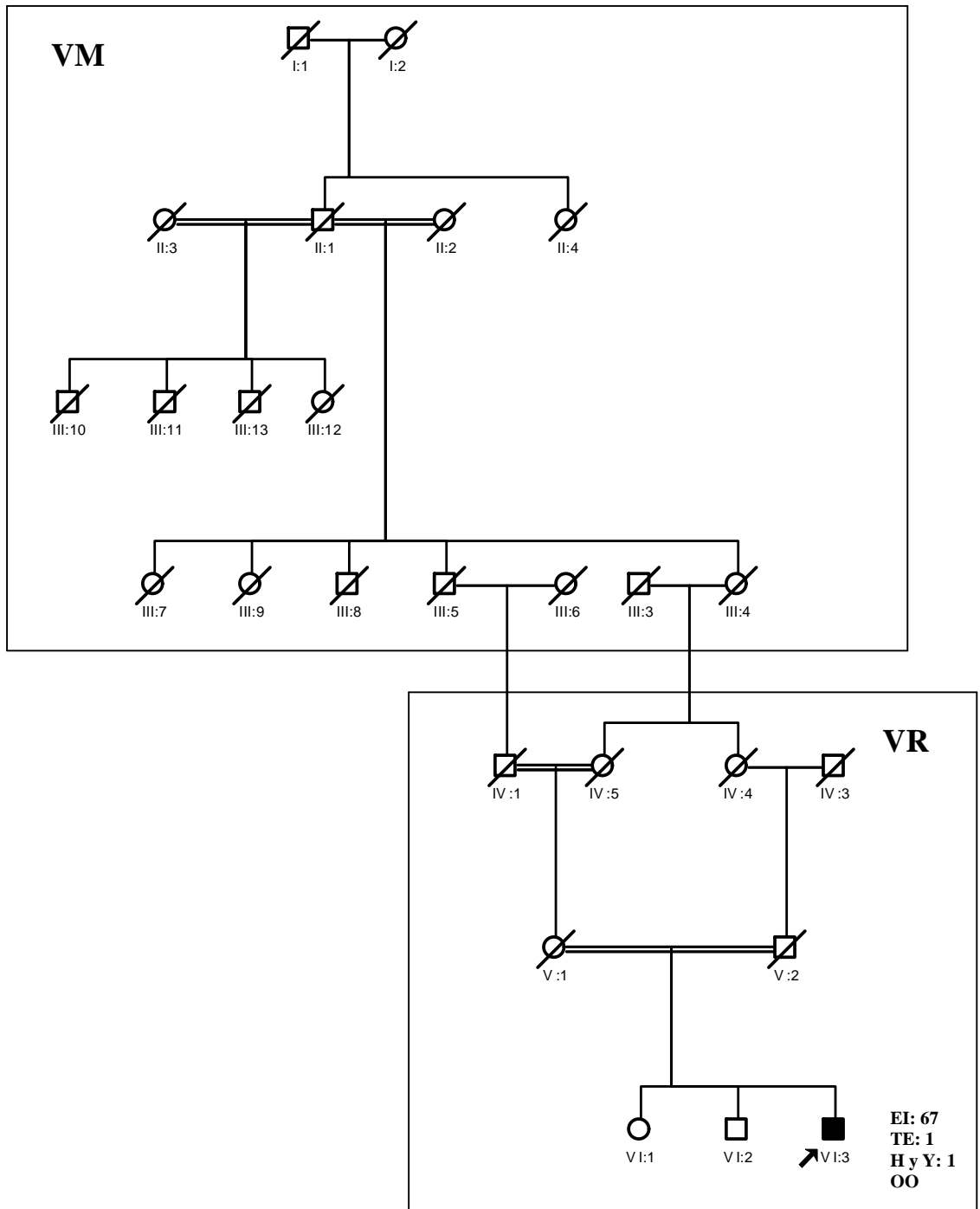


Figura 14. Arbol genealógico familia 2. EI: edad de inicio. TE: tiempo de evolución. H y Y: Hoehn y Yahr.

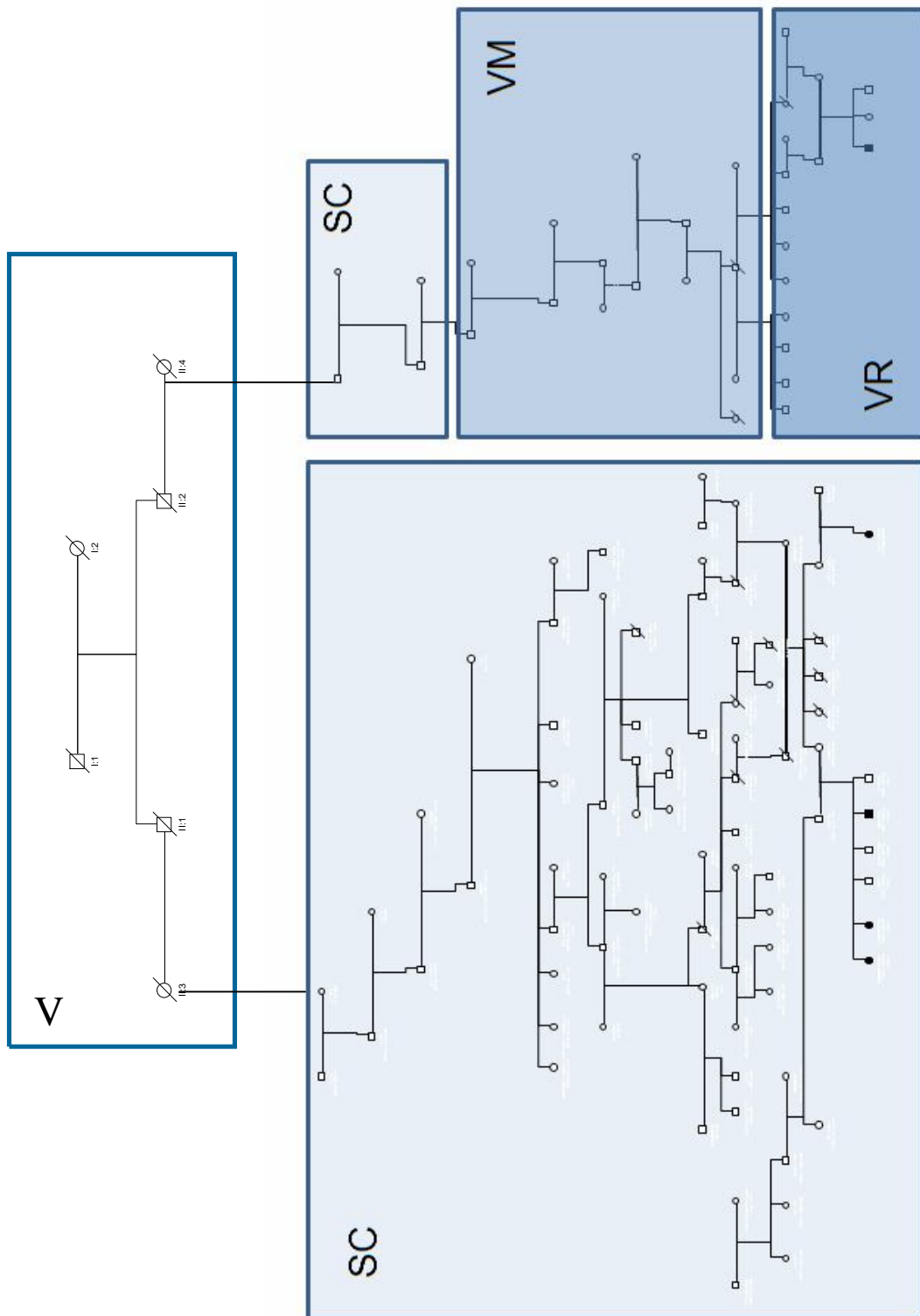


Figura 14 b. Genealogía de las familias 1-2, en las que a medida que nos remontamos a generaciones anteriores cambia el lugar de origen de la familia 2, que en fechas anteriores a el año 1700, tiene su origen en la misma localidad que la familia 1 (SC). Las dos familias derivan de un ancestro común nacido en la segunda mitad del siglo XVI.

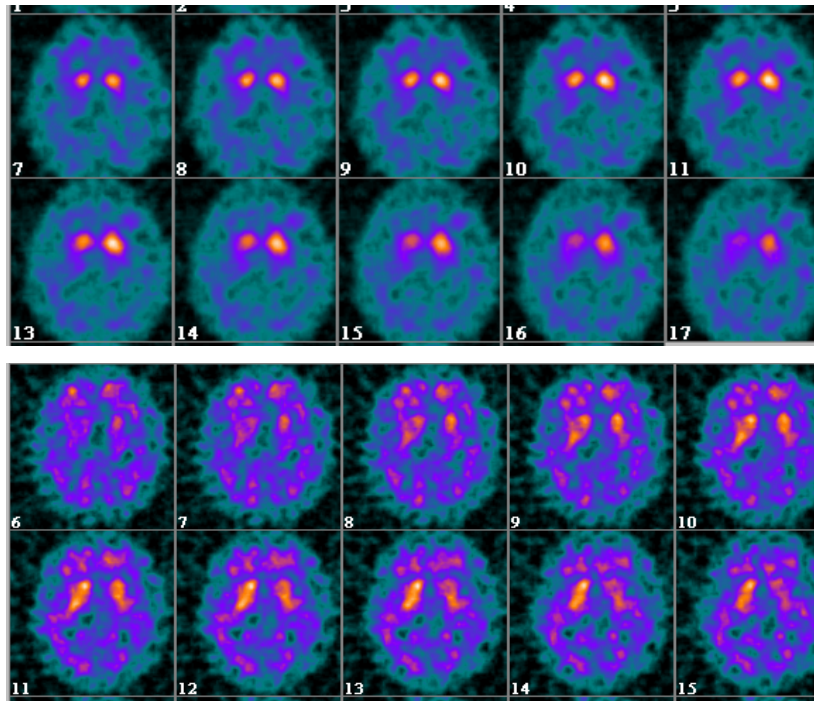


Figura 15: Figura A: Iodine-123-betaIoflupane (Datscan) paciente IV-3 familia 2(arriba). Se aprecia una captación reducida bilateral, asimétrica en putamen y núcleo caudado, demostrativa de una lesión presináptica responsable de la sintomatología clínica. Figura B: IBZM SPECT paciente IV-3 familia 2 (abajo). Se aprecia una captación reducida en ganglios basales y cortex frontal. Cortesía de la Dra. Rioja (Servicio de Medicina Nuclear, Hospital Ramón y Cajal).

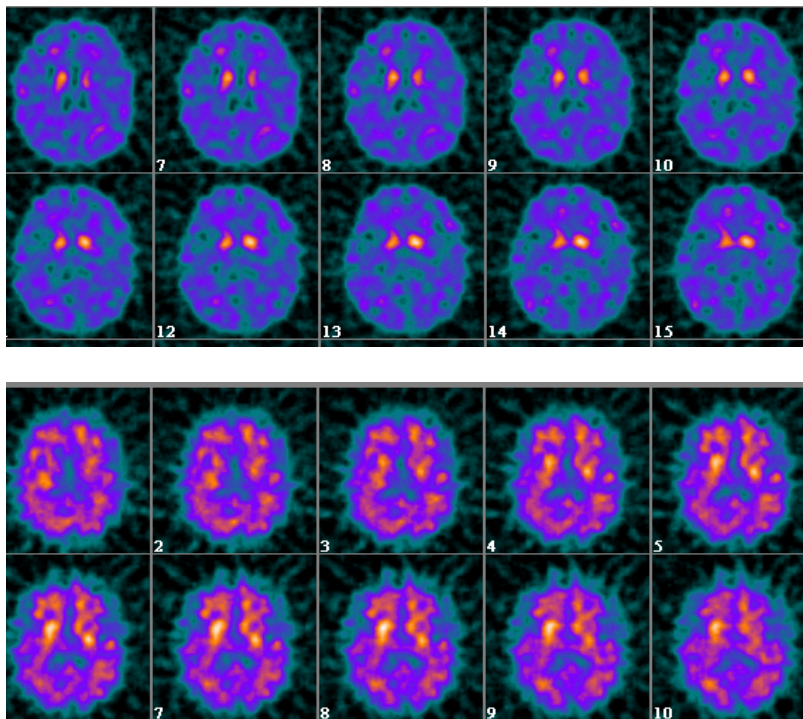


Figura 16: Figura A: Iodine-123-betaIoflupane (Datscan) paciente IV-5, familia 1 (arriba). Se aprecia una captación reducida bilateral, asimétrica en putamen y núcleo caudado, demostrativa de una lesión presináptica responsable de la sintomatología clínica. Figura B: IBZM SPECT paciente IV-5, familia 1 (abajo). Normal. Cortesía de la Dra. Rioja (Servicio de Medicina Nuclear, Hospital Ramón y Cajal).

Familia 3: la familia representada en la figura 17, es una familia extensa originaria de un pueblo del sur de España, con algunos miembros residiendo en Madrid. Presenta un total de 7 individuos afectados en tres generaciones sucesivas, con un patrón de herencia autosómico dominante, sin poder descartar un patrón pseudodominante. En la actualidad permanecen con vida 3 de los 7 afectados, habiéndose efectuado la necropsia al individuo III-19. Su fenotipo clínico es comparable a un Parkinson esporádico, con inicio asimétrico, rigidez en rueda dentada, bradicinesia e inestabilidad postural. La media de edad de inicio de los síntomas es 67.2 ± 3.9 (SD), con un rango de 61 a 71 años. No hay datos de parkinsonismo atípico. Se realizó autopsia completa del caso III-19. La descripción macroscópica del cerebro reveló en su examen externo ausencia de atrofia cortical evidente en la convexidad. En los cortes seriados coronales de ambos hemisferios se observó una discreta dilatación asimétrica del ventrículo lateral izquierdo. Ausencia de lesiones focales. La pigmentación de la sustancia nigra y *locus coeruleus* se mantenía conservada. A nivel microscópico, las áreas corticales estudiadas mostraban una arquitectura conservada, sin pérdida neuronal aparente, con mínima astrocitosis. Presencia de placas seniles maduras, con mayor densidad en córtex occipital lateral, córtex singular y córtex temporal y angiopatía amiloide de vasos intracorticales superficiales. Destaca la ausencia de cuerpos de Lewy corticales u otras estructuras positivas para α -sinucleína. Ausencia también de espongiosis neuropílica transcortical o laminar y población neuronal de la sustancia nigra conservada. Mediante la inmunotinción para tau se observaron ocasionales ovillos tau+ intraneuronales. Por tanto, en conclusión, la anatomía patológica del caso III-13 reveló placas seniles y degeneración neurofibrilar sin afectación de la *substantia nigra* ni CL (figura 18).

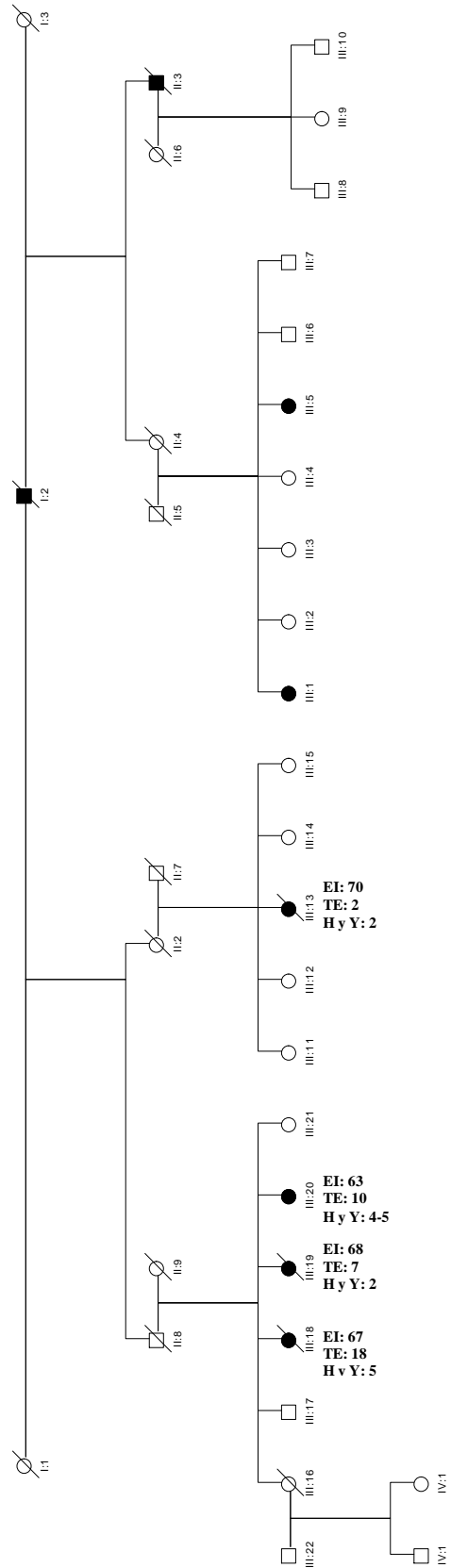


Figura 17: Arbol genealógico familia 3. EI: edad de inicio. TE: tiempo de evolución. H y Y: Hoehn y Yahr.

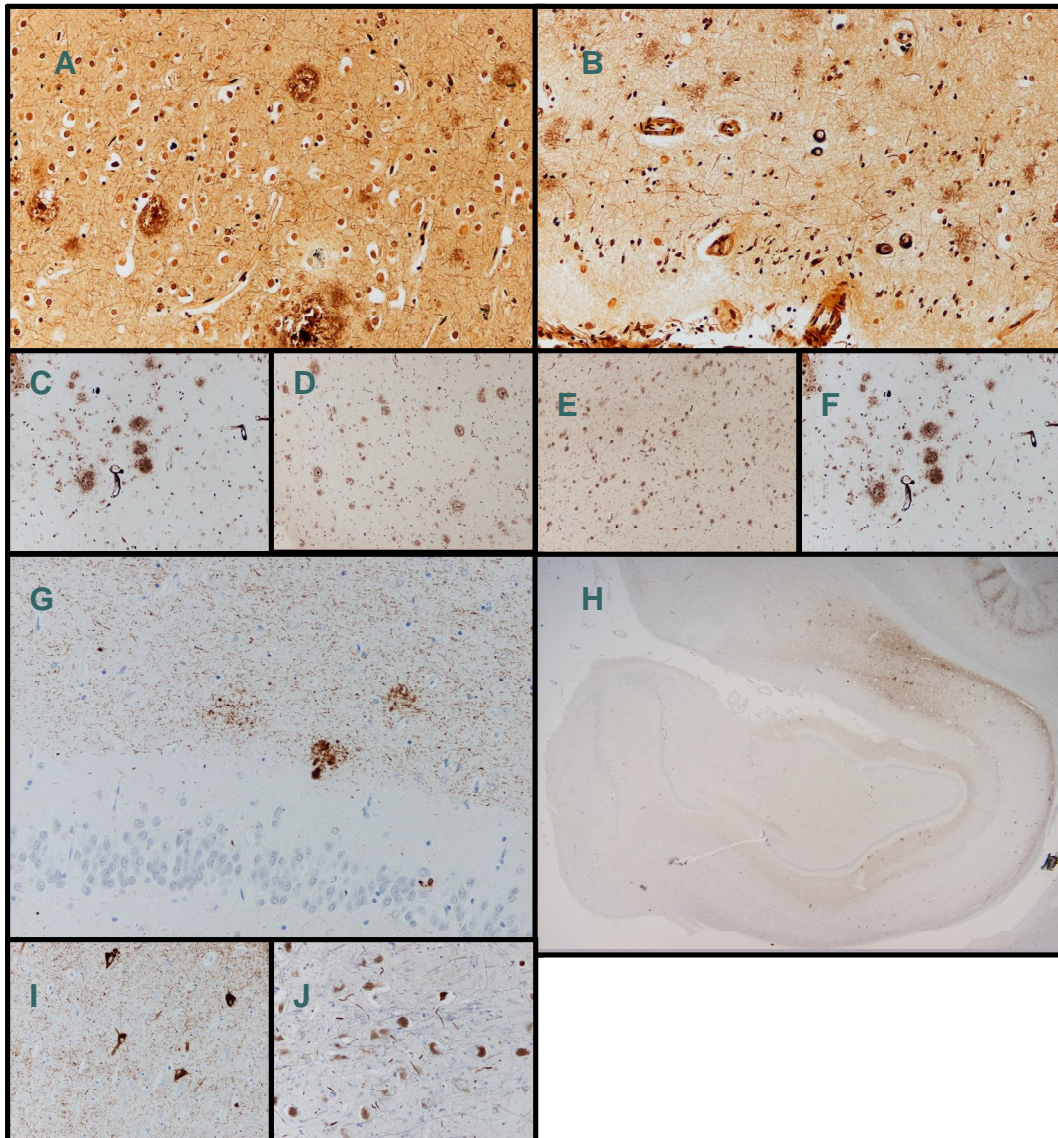


Figura 18:

Imágenes correspondientes a estudio histológico e inmunohistoquímico de la paciente III-19. **A:** plata metenamina gran aumento 2: imagen de mediano aumento de córtex cerebral, tinción de plata metenamina modificada. Se observan varias placas neuríticas con núcleo (“core”) de amiloide (teñido de negro con la técnica). **B:** plata metenamina parietal gran aumento vasos: imagen de mediano aumento de córtex cerebral (parietal, área CERAD), capas superiores, tinción de plata metenamina modificada. Se observan varios depósitos difusos de amiloide, así como vasos de pequeño calibre con depósito parietal de amiloide (negro). **C:** plata metenamina parietal gran aumento vasos y placas: imagen de mediano aumento de córtex cerebral (parietal, área CERAD), tinción de plata metenamina modificada. Se observan placas maduras, sin núcleo, y depósitos de amiloide vascular en vasos de pequeño calibre (negro). **D:** plata metenamina parietal mediano aumento: imagen de mediano aumento de córtex cerebral (parietal, área CERAD), tinción de plata metenamina modificada. Se observan pequeños depósitos difusos de amiloide y placas neuríticas con núcleo amiloide (imágenes “en diana”). **E:** plata metenamina placas bajo aumento: imagen de bajo aumento de córtex cerebral, tinción de plata metenamina. Se observa alta densidad de placas seniles, con predominio de placas maduras y neuríticas. **F:** plata metenamina placas mediano aumento: imagen de mediano aumento de córtex cerebral, tinción de plata metenamina modificada. En la imagen predominan placas maduras, sin núcleo amiloide. **G:** giro dentado tau gran aumento: imagen de gran aumento del giro dentado del hipocampo, inmunotinción para tau (AT8). Se observa alta densidad de hebras neuropílicas en el segmento superior de la capa molecular (proyección de la vía perforante), y neuritas distróficas correspondientes a varias placas neuríticas. **H:** hipocampo tau: imagen de muy bajo aumento de hipocampo anterior, inmunotinción para tau (AT8). Se observa patología neurofibrilar en subíulum y sector CA1, así como en la capa molecular del giro dentado. **I:** hipocampo tau gran aumento: imagen de gran aumento de subíulum, inmunotinción para tau (AT8). Se observan neuronas piramidales positivas (pre-ovillos), ovillos neurofibrilares y alta densidad de hebras neuropílicas. **J:** nigra tau gran aumento: imagen de gran aumento de la sustancia nigra compacta,

inmunotinción para tau (AT8). Se observa un ovillo neurofibrilar y hebras neuropílicas. Cortesía del Dr. Alberto Rábano (Banco de Tejidos, Hospital de Alcorcón).

Familia 4: la familia representada en la figura 19, es una extensa familia perteneciente a un pueblo aislado de la provincia de Soria. Analizamos dos familias nucleares, la 4a con un total de dos afectos (fue evaluado uno de ellos, individuo II-3). La tabla 3 muestra las características clínicas de las dos familias nucleares estudiadas, pertenecientes a esta extensa familia (escala Hoehn y Yahr y la edad de inicio de la enfermedad). La familia 4a presenta un total de individuos afectos de 2, con un patrón de herencia autosómico recesivo. En la actualidad permanecen con vida los dos. Es importante la existencia de cosanguinidad de los padres, no afectos. Su fenotipo clínico es comparable a un Parkinson esporádico, con inicio asimétrico, rigidez en rueda dentada, bradicinesia e inestabilidad postural. No hay datos de parkinsonismo atípico. La familia 4b presenta un total de 1 individuo afecto, con un patrón de herencia autosómico recesivo.

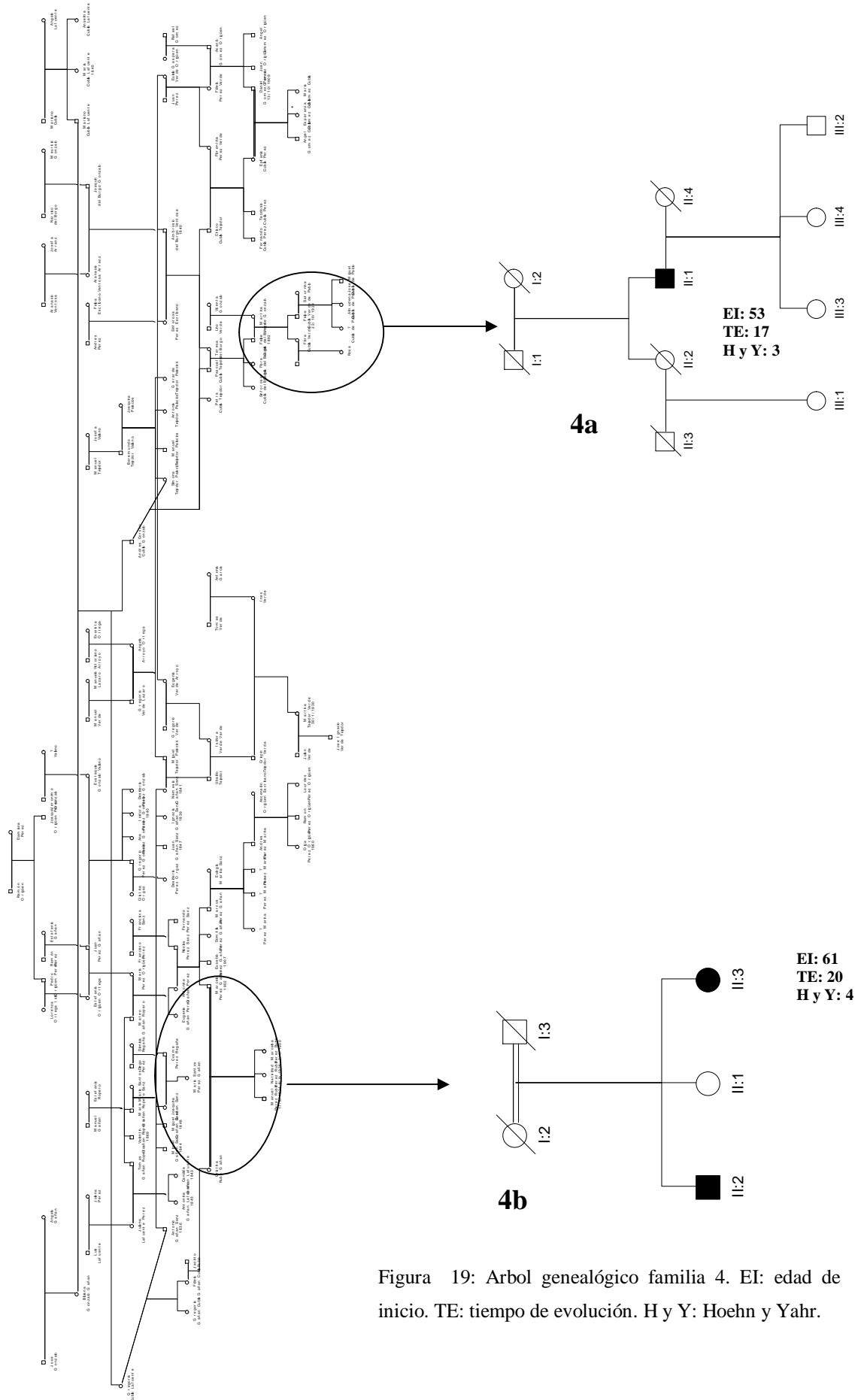


Figura 19: Arbol genealógico familia 4. EI: edad de inicio. TE: tiempo de evolución. H y Y: Hoehn y Yahr.

e

Familia 5: la familia representada en la figura 20, es una familia perteneciente a otro pueblo perteneciente a la provincia de Soria, con miembros afectados en todas las generaciones (5 afectados). Fueron evaluados dos de ellos (III-1, III-3, familia 5). A pesar de un aparente patrón de herencia dominante, no se puede descartar un patrón pseudodominante, por lo que también fue incluida en el estudio. En la actualidad permanecen con vida dos de los cinco afectados (individuo III-3, probando e individuo III-1). Su fenotipo clínico es comparable a un Parkinson esporádico, con inicio asimétrico, rigidez en rueda dentada, bradicinesia e inestabilidad postural. La edad de inicio de los síntomas es tardío, aproximadamente en torno a los 70 años para ambos. No hay datos de parkinsonismo atípico.

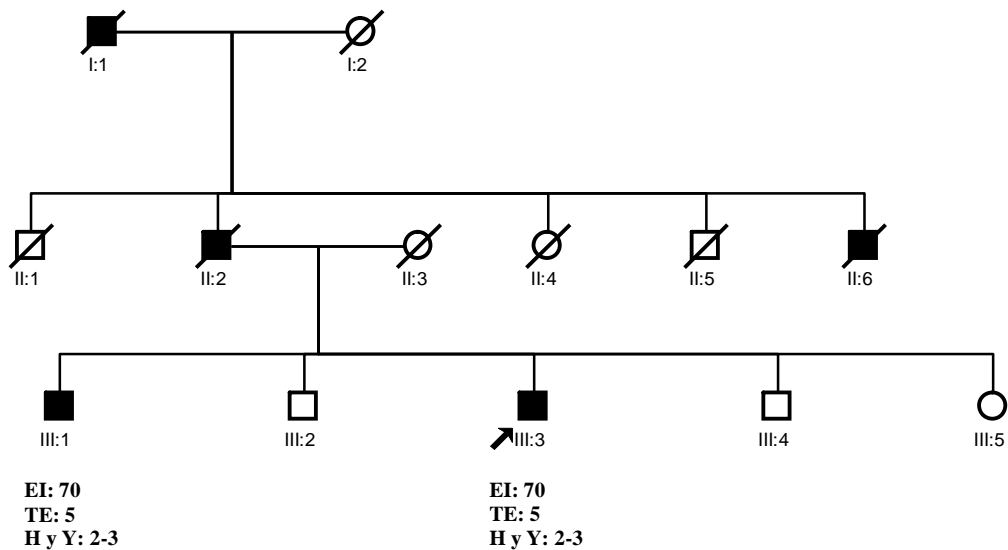


Figura 20: Arbol genealógico familia 5. EI: edad de inicio. TE: tiempo de evolución. H y Y: Hoehn y Yahr.

FAMILIAS	PACIENTES	EDAD INICIO	TIEMPO EVOLUCION AÑOS	HOEHN Y YAHR	RESPUESTA A L-DOPA
1	V-1	68	5	2	BUENA
	V-5	66	8	4	BUENA
2	VI-3	67	1	1	BUENA
3	III-18	49	18	5	BUENA
	III-19	68	7	2	BUENA
	III-20	63	10	4-5	BUENA
	III-13	70	2	2	BUENA
4a	III-1	53	17	3	BUENA
4b	II-.3	61	20	4	BUENA
5	III-1	70	5	2-3	BUENA
	III-3	70	5	2-3	BUENA

TABLA 3: Características fenotípicas de los agregados familiares.

6.2. ANALISIS DE SEGREGACION COMPLEJA.

Tras examinar los nueve modelos de herencia descritos en la sección Material y Métodos, no es posible rechazar ningún modelo incluido la no transmisibilidad o efecto cohorte. El análisis estadístico se ha realizado mediante una χ^2 con grados de libertad igual a la diferencia en el número de parámetros no iterados en cada modelo (tabla 4), siendo por tanto el análisis no concluyente.

Modelos	-2ln(L)	d	t	q	H	t1	t2	t3	Z	g. de l.
(1)no transmisibilidad	34.78	(0)	(0)	(0)	(0)	-	-	-	-	8
(2)multifactorial	27.71	(0)	(0)	(0)	0.85	-	-	-	(1)	7
(3)dominante	27.19	(1)	2.7	0.03	(0)	(1.0)	(0.5)	(0.0)	(1)	6
(4)recesivo	27.20	(0)	3.11	0.21	(0)	(1.0)	(0.5)	(0.0)	(1)	6
(5)t1=t2=t3	27.18	(1)	2.35	0.03	0,00	0.97	0.97	0.97	(1)	1
(6)mixto no restringido d	27.19	0.0	2.89	0.039	(0.0)	(1.0)	(0.5)	(0.0)	(0)	5
(6)mixto	26.58	1.0	1.61	0.773	0,64	(1.0)	(0.5)	(0.0)	(0)	4
(6)general(no restricto)	29.58	1.0	0.5	0.00004	0,40	1.0	0.00	0.00	0.00	0

Tabla 4. Análisis de Segregación Compleja. $-2\ln(L)$: liability class; d: distancia genética; t: las desviaciones típicas de desplazamiento en locus mayor simple entre los dos homocigotos; q: frecuencia del gen; H: heredabilidad poligénica a la descendencia; t_1 : probabilidad del genotipo homocigoto para el gen mayor; t_2 : probabilidad del genotipo heterocigoto para el gen mayor; t_3 : probabilidad del genotipo homocigoto para el no gen Mendeliano; Z: ; g. de l.: grados de libertad.

La frecuencia del gen candidato, en caso de tratarse de una forma genéticamente condicionada, sería de 0,00004 (según el modelo general) y la heredabilidad del mismo a la descendencia de un 60%, existiendo interacciones epistáticas ($t_2 < 0.5$).

El ASC aporta cifras de penetrancia según la edad y genotipo, siendo del 55.1% para las formas homocigotas en los mayores de 80 años. (ver tabla 5, figura 21).

Edad	AA	Aa	aa
<60 años	0.025	0.025	0.00
60-70 años	0.389	0.389	0.00
70-80 años	0.443	0.443	0.0001
>80 años	0.551	0.551	0.0002

Tabla 5. Penetrancias del gen mayor propuesto según la edad.

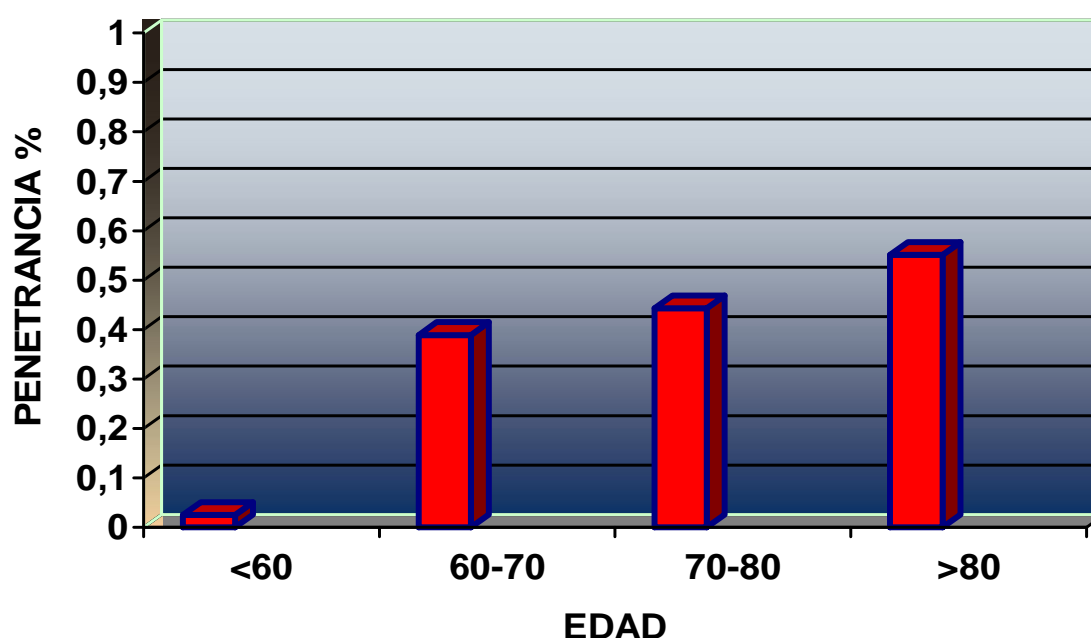


Figura 21. Diagrama de penetrancias del gen según la edad. Resultados del ASC.

6.3.GENETICA MOLECULAR DE LOS GENES CONOCIDOS.

El producto de PCR purificado conteniendo el resultado del estudio de PARKIN, DJ-1 y PINK1 fue genotipado, descartándose la implicación de estos genes en los agregados familiares propuestos (Figura 22, 23 y 24).

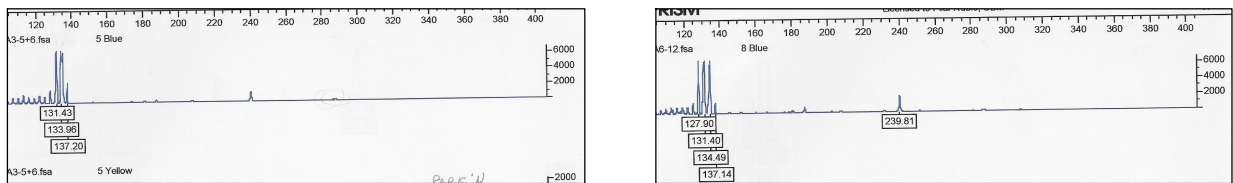


Figura 22: Genotipado PARKIN. Primers 1035/980. Paciente III-5, Familia 1. Paciente III-3, Familia 2.

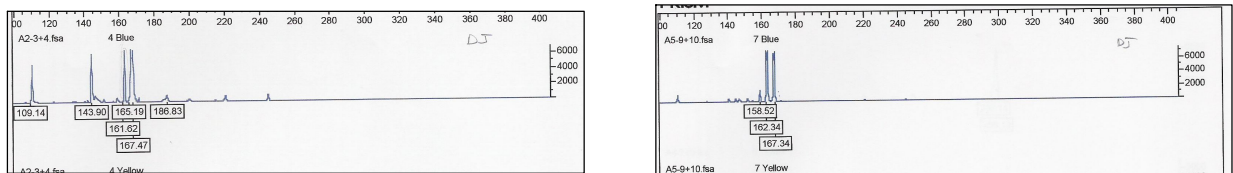


Figura 23: Genotipado DJ1. Primers 548/1612. Paciente III-5, Familia 1. Paciente III-3, Familia 2.

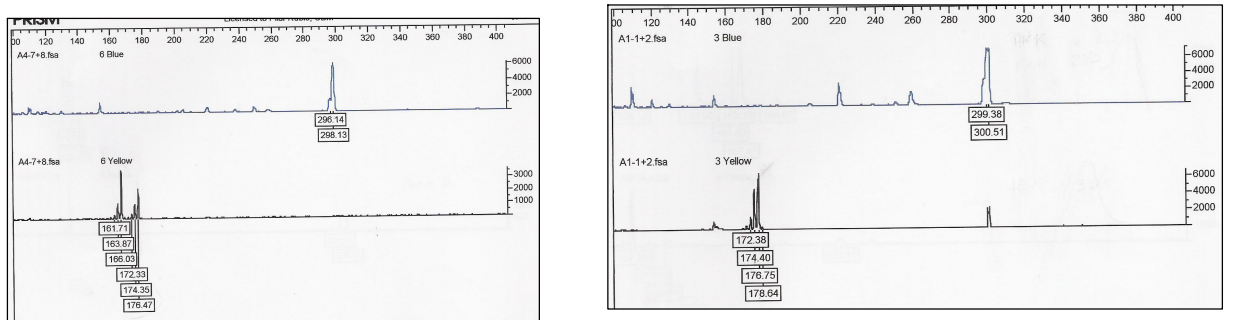


Figura 24: Genotipado PINK 1. Primers 478/1571. Paciente III-5, Familia 1. Paciente III-3, Familia 2.

Se estudió también la mutación G2019S de LRRK2 realizando igualmente una PCR del exón 41 (Figura 25) y secuenciándolo (Figura 26).

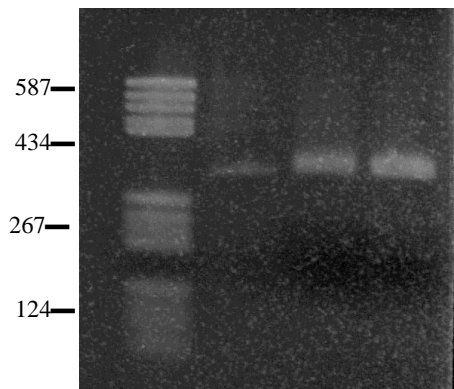


Figura 25: Gel de agarosa, PCR del exón 41 de los pacientes III-3, P167 y P175. V: marcador de peso molecular.

V III-3 P167 P175

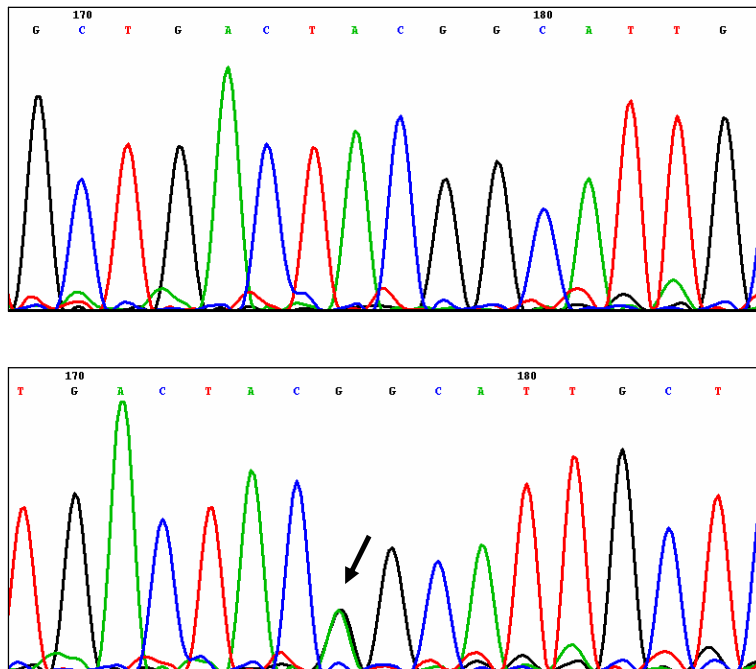


Figura 26: Izquierda: Secuenciación exón 41 de la LRRK2 del paciente III-5, Familia 1. Ausencia de la mutación G2019S. Derecha: ejemplo de mutación G2019S del exón 41, otro paciente.

El mismo procedimiento fue empleado para los seis exones de la SNCA (Figura 27.).

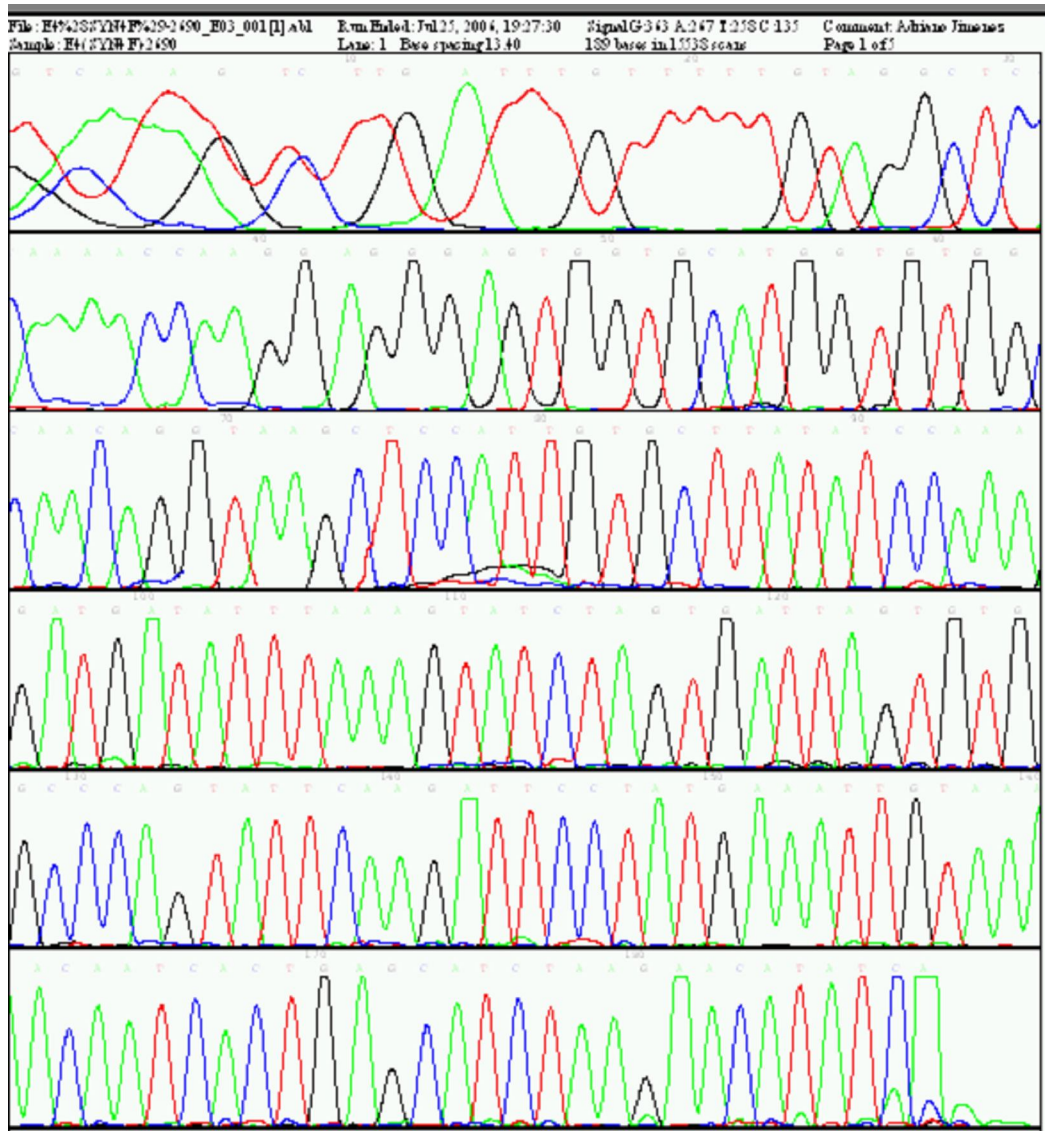


Figura 27: Secuenciación exón 4 de la SNCA del paciente III-5, Familia 1. Ausencia de mutaciones.

6.4. MAPEO DE HOMOZIGOSIDAD DE LAS REGIONES GENÉTICAS LIGADAS A LA ENFERMEDAD DE PARKINSON MEDIANTE UN ARRAY DE ALTA DENSIDAD DE SNP (500 K) CON EL PROGRAMA PLINK.

Una vez conocido los patrones de herencia y la estructura de las familias descritas anteriormente, procedimos a un estudio de localización de regiones que contengan los posibles genes causales mediante el array Affymetrix de 500K. Dicho estudio se llevó a cabo en las familias 1-2 y 4 que son las que presentan las dos condiciones necesarias para poder ser estudiadas mediante esta técnica: un patrón de herencia recesivo y una distancia entre generaciones de más de 5 generaciones entre ellos.

El estudio con microarrays comprende dos fases, la primera examinar las regiones con homocigosidad y la segunda evaluar la presencia de cambios en la dosis génica.

6.4.1 MAPEO POR HOMOZIGOSIDAD

Para el mapeo por homocigosidad se seleccionaron aquellas regiones que presentaron zonas de identidad alélica de más de 100 SNPs en la familia 1-2 y más de 150 SNPs en la familia 4.

En la tabla 6 se muestra la localización cromosómica, SNPs que delimitan la región, la localización genética y el tamaño de la región, así como el número de SNPs que son idénticos.

En las figuras 29 a 34 se muestran la localización de las regiones y los genes que existen en dicha región.

En las figuras 28 a, b y c se muestran los resultados obtenidos del array.

enez_2006-09-19_Nsp_Wdh.txt - Bloc de notas

Edición Formato Ver Ayuda

ic Model Mapping Analysis

SNP ID	Chromosome	Physical Position	dbSNP	RS ID	CBE_FLO_A200_150906_Mendel_Nsp_wdh_Call	CBE_FLO_A201
SNP_A-1780520	20	47574178	rs16994928	BB	BB	BB
SNP_A-1780618	4	10503116	rs233978	NOCall	BB	BB
SNP_A-1780632	14	51975831	rs2249922	BB	BB	BB
SNP_A-1780654	1	20912710	rs7553394	AA	AA	AA
SNP_A-4192495	16	56554433	rs17821448	BB	AB	AB
SNP_A-4192498	12	2591398	rs216008	BB	BB	BB
SNP_A-1780732	7	102354462	rs12540583	BB	BB	BB
SNP_A-1780848	3	4691811	rs2306877	BB	BB	BB
SNP_A-1780985	18	32432188	rs3859360	BB	BB	BB
SNP_A-1781022	11	77691705	rs10899467	AA	AA	AA
SNP_A-1781076	14	86783793	rs1682558	BB	AB	AB
SNP_A-1781249	22	19332721	rs635095	AA	AB	AB
SNP_A-1781276	4	66574787	rs7683949	AA	AA	AA
SNP_A-1781302	5	53642052	rs35941	AB	BB	BB
SNP_A-1781510	16	76983363	rs7192626	AA	AA	AA
SNP_A-4192564	9	12511826	rs16929097	BB	BB	BB
SNP_A-1781614	5	22436938	rs16895132	AB	AA	AB
SNP_A-1781633	11	5109857	rs2472530	AA	AA	AA
SNP_A-1781764	18	64214239	rs12327228	BB	BB	BB
SNP_A-1781829	16	6722280	rs4525489	AA	AA	AA
SNP_A-1781832	16	6222304	rs10492838	AB	AA	AA
SNP_A-1781982	10	66106365	rs10822332	AA	AA	AA
SNP_A-1782155	9	100172162	rs10819760	AA	AB	AA
SNP_A-1782305	15	20351272	rs8031642	AB	AA	AB
SNP_A-1782891	4	170067621	rs7680120	AB	BB	NOCall
SNP_A-1782949	10	55073232	rs17696599	BB	BB	BB
SNP_A-4192675	22	20865611	rs5995816	BB	AB	AB
SNP_A-1783398	8	15317330	rs4831722	BB	BB	BB
SNP_A-1783496	11	77954925	rs10751296	AA	AB	AA
SNP_A-1784032	3	195957808	rs3890437	BB	AB	BB
SNP_A-1784070	3	14589760	rs17039825	BB	BB	BB
SNP_A-1784149	14	59818871	rs7154773	AA	AA	NOCall
SNP_A-1784362	17	59399287	rs7218917	AA	AA	AA
SNP_A-1784506	11	102171526	rs470558	AA	AB	AA
SNP_A-1784513	17	73742324	rs11077350	AB	BB	NOCall
SNP_A-1784836	9	23476165	rs274932	AA	AA	AA
SNP_A-1784941	6	158996788	rs16900870	AA	AA	AA
SNP_A-1785311	1	204399469	rs947658	BB	BB	BB
SNP_A-1785727	1	94805431	rs17111912	BB	BB	BB
SNP_A-1785929	20	47958234	rs2769982	AB	AB	AA
SNP_A-1785957	10	19924131	rs16919132	BB	BB	BB
SNP_A-4192909	5	175934750	rs4242200	AB	AA	AA
SNP_A-4192918	16	77084566	rs2738718	AA	AA	AA
SNP_A-4193077	7	743177726	rs10235560	BB	AB	BB

Figura 28 a. Ejemplo del resultado del array de 500 K.

En las figuras 28 b y c se muestran las regiones en homocigosidad (medidas en Kb) de todo el genoma mayores de 100-150 SNPs. En ellos se aprecia zonas en homocigosidad de gran tamaño (>4000 KB) fundamentalmente en el individuo con mayor carga de con-sanguinidad (Figura 28 b) Dichas regiones no pueden ser explicadas por el azar al ser mayores de 3000 Kb y pueden ser interpretadas a través de la herencia genética con un efecto-fundador.

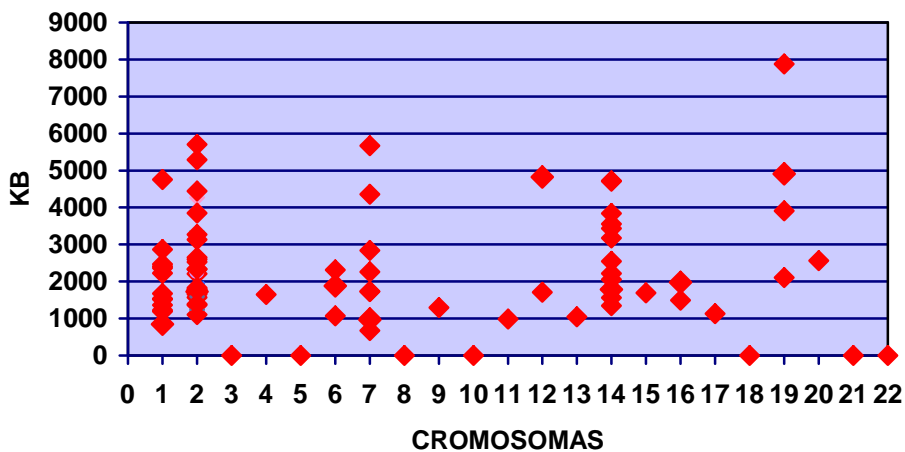


Figura 28 b: Regiones en homocigosidad de más de 150 SNP de tamaño pertenecientes al caso VI-3 de la familia 2. Resultado del Array de 500K. Se muestra cada cromosoma y el tamaño de dichas regiones en Kb.

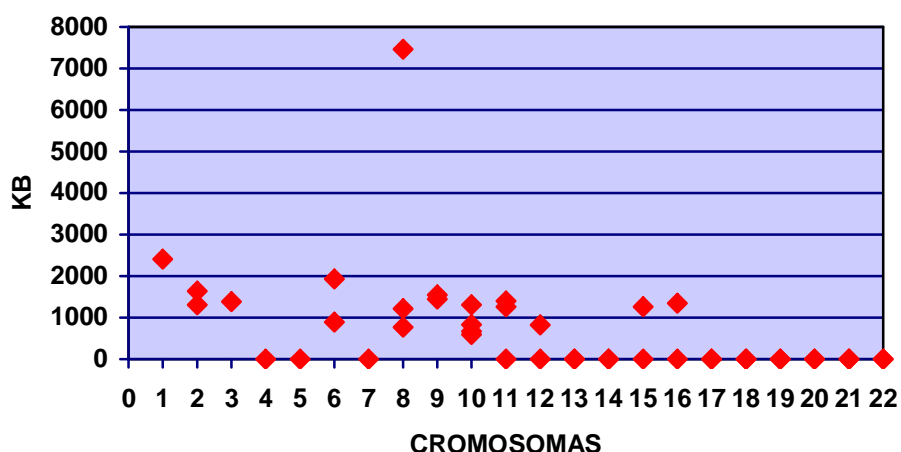


Figura 28 c: Regiones en homocigosidad de más de 100 SNP de tamaño pertenecientes al caso V-I de la familia 1. Resultado del Array de 500K. Se muestra cada cromosoma y el tamaño de dichas regiones en Kb.

El método analítico PLINK ofrece la posibilidad de obtener las regiones compartidas en homocigosidad por los tres casos ejemplo mediante el análisis de todo el genoma (Tabla 6). Las regiones candidatas obtenidas pertenecen a los cromosomas 6, 4, 8 y 7.

Se realizó un análisis de clusters de los individuos pertenecientes a la familia 4 (ver tabla 6).

CLUSTERS PACIENTES	BP1	BP2	KB	NSNP	CH R	GEN/ PROTEINA
V-1 y V-5, familia 1 VI-3, familia 2	128476625	129183196	706.571	110	6	PTPRK (<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor</i>)
V-1 y V-5, familia 1 VI-3, familia 2	33132456	34298641	1166.18	126	4	-
II-1 familia 4a y II-3 familia 4b	62181098	62804551	623.453	142	8	ASPH_HUMAN (<i>Aspartate beta-hydroxylase</i>)
						RLBP1L1 (<i>retinaldehyde binding protein 1-like 1</i>)
II-1 familia 4a y II-3 familia 4b	51681895	52637092	955.197	161	8	SNTG1_HUMAN (<i>Gamma-1-syntrophin</i>)

							PXDNL (<i>peroxidasin homolog (Drosophila)-like</i>)
II-1 familia 4a y familia 4b	II-3	42737547	48116305	5378.76	148	8	ACHA6_HUMAN (<i>Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-6 precursor</i>)
							THAP1_HUMAN (<i>THAP domain-containing protein 1</i>)
							POTE8_HUMAN (<i>Prostate, ovary, testis-expressed protein on chromosome 8</i>)
							RN170_HUMAN (<i>RING finger protein 170</i>)
							HOOK3_HUMAN (<i>Hook homolog 3</i>)
							PFTA_HUMAN (<i>Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha</i>)
							SG196_HUMAN (<i>Protein kinase-like protein SgK196</i>)
							HGNAT_HUMAN (<i>Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase</i>)
II-1 familia 4a y familia 4b	II-3	103392153	104025139	632.986	151	7	ORC5_HUMAN (<i>Origin recognition complex subunit 5</i>)
							LHPL3_HUMAN (<i>Lipoma HMGIC fusion partner-like 3 protein</i>)
							RELN_HUMAN (<i>Reelin precursor</i>)

Tabla 6: Regiones compartidas en homocigotidad. PLINK. BP1: pares de bases, posición inicial; BP2: pares de bases, posición Terminal; KB: kilobases; NSNP: número de single nucleotide polymorphisms; CHR: cromosoma.

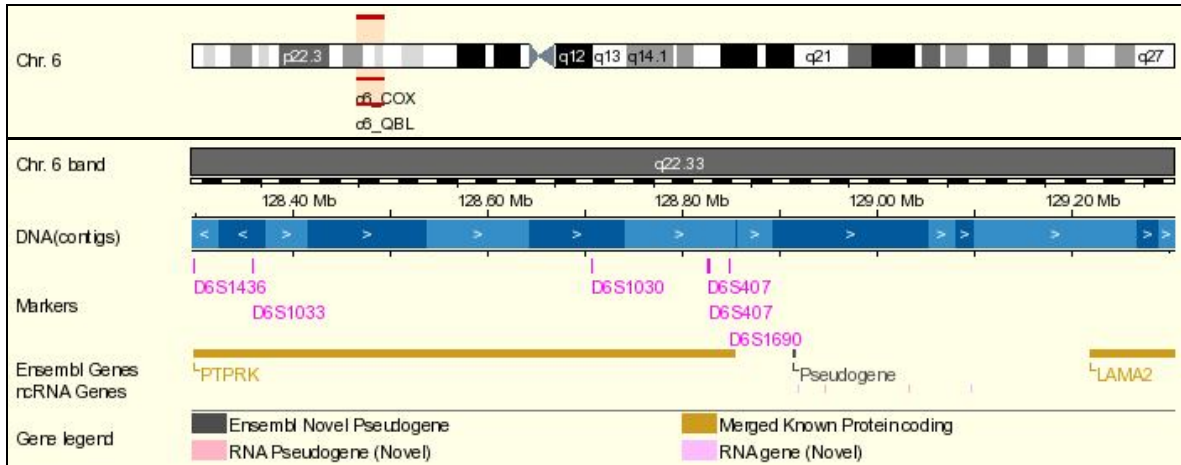


Figura 29. Región 128476625-129183196 cromosoma 6. Gen PTPRK.

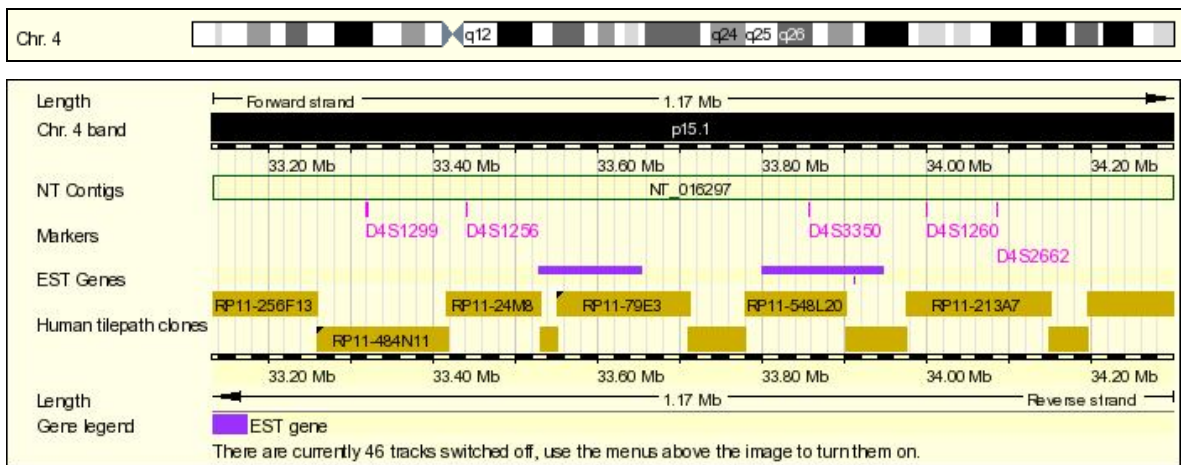


Figura 30. Región 33132456-34298641 cromosoma 4. Ausencia de genes candidatos.

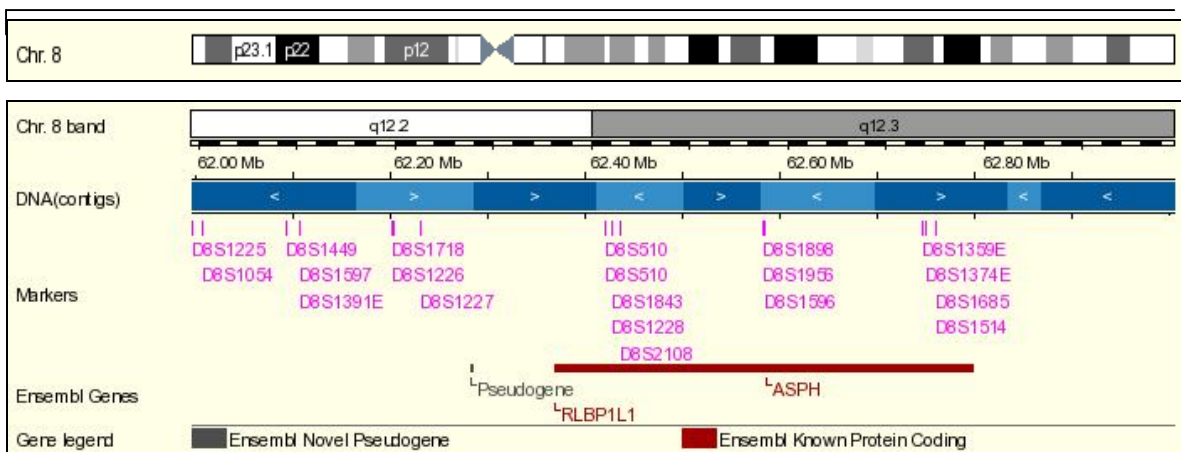


Figura 31. Región 62181098-62804551 cromosoma 8. Genes ASPH_HUMAN y RLBP1L1.

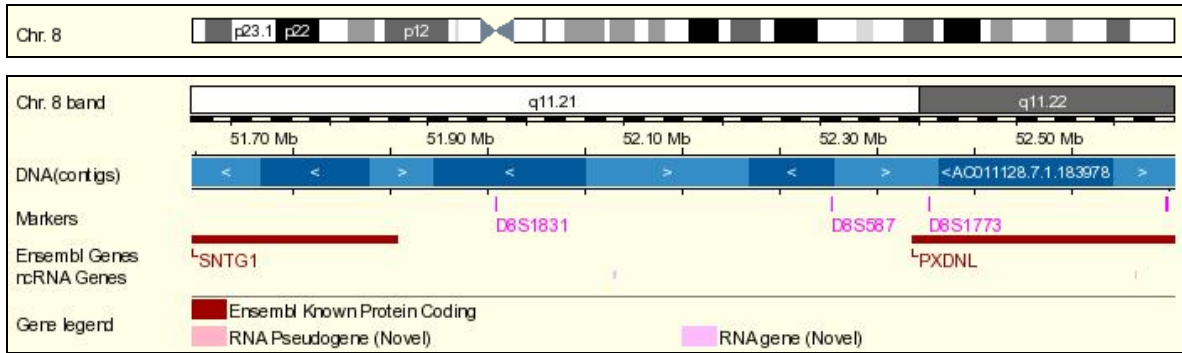


Figura 32. Región 51681895-52637092 cromosoma 8. Genes SNTG1_HUMAN y PXDNL.

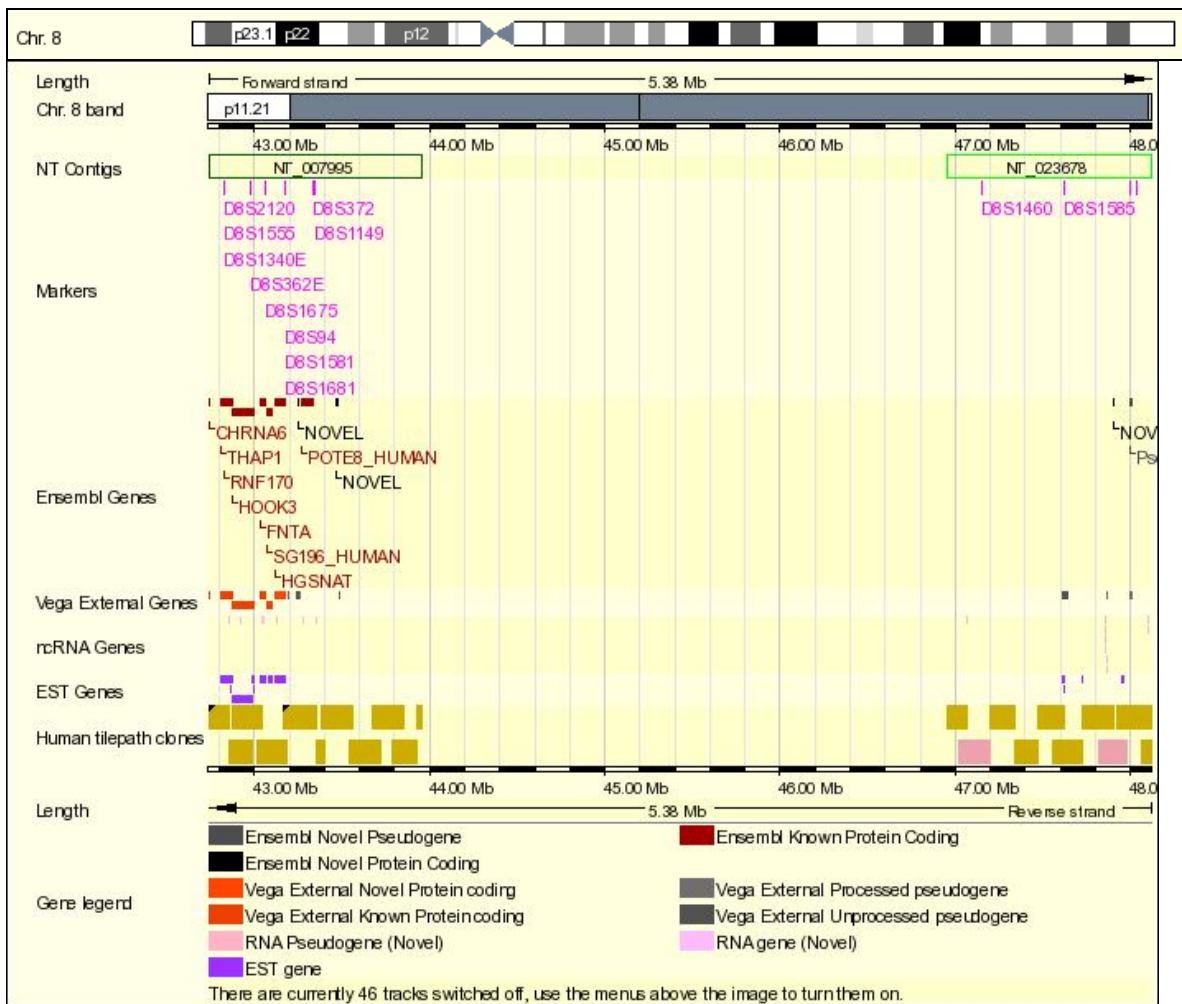


Figura 33. Región 42737547-48116305 cromosoma 8. Genes ACHA6_HUMAN, THAP1_HUMAN, POTE8_HUMAN, RN170_HUMAN, HOOK3_HUMAN, PFTA_HUMAN, SG196_HUMAN y HGNAT_HUMAN.

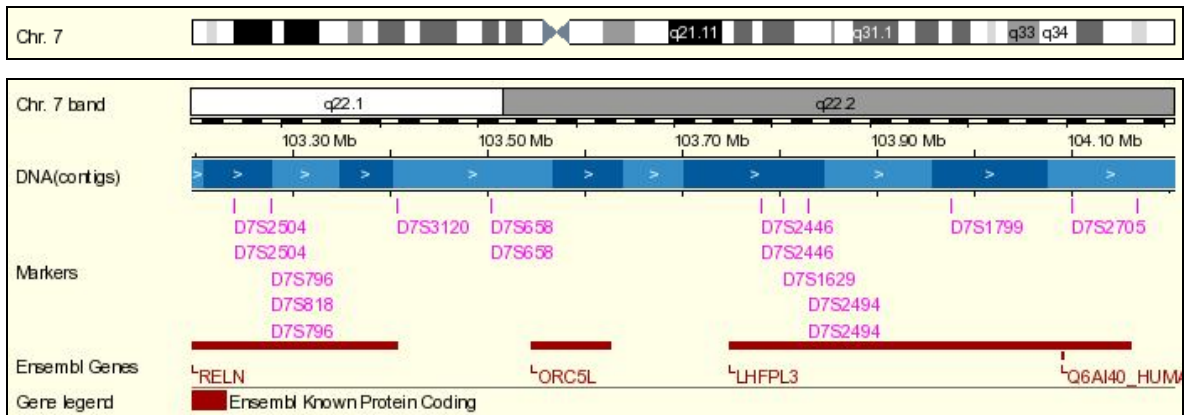


Figura 34. Región 103392153-104025139 cromosoma 7. Genes ORC5_HUMAN, LHFPL3_HUMAN y RELN_HUMAN.

6.5. ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD EN EL NUMERO DE COPIAS GENÉTICAS CON EL PROGRAMA CNAT (COPY NUMBER ANALYSIS TOOL).

El examen de la CNV en la región de los genes PARKIN, DJ-1 y PINK 1 o en las regiones de interés (zonas de homocigotidad compartidas por los afectados) no mostró anomalías. Las figuras 35, 36 y 37 muestran respectivamente los resultados de este examen en la región de los genes PARKIN, DJ-1 y PINK 1 en todo el genoma en el caso VI-3 de la familia 2.

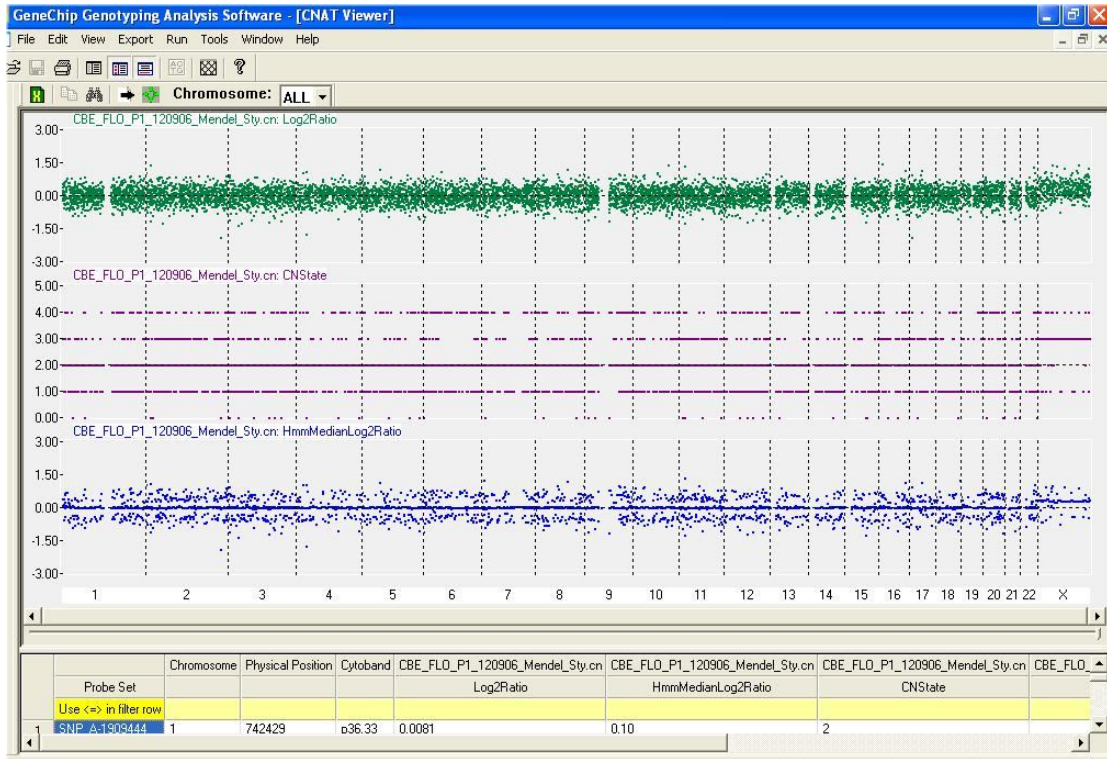


Figura 35. Resultado del CNV en todo el genoma en el paciente VI-3, familia 2.

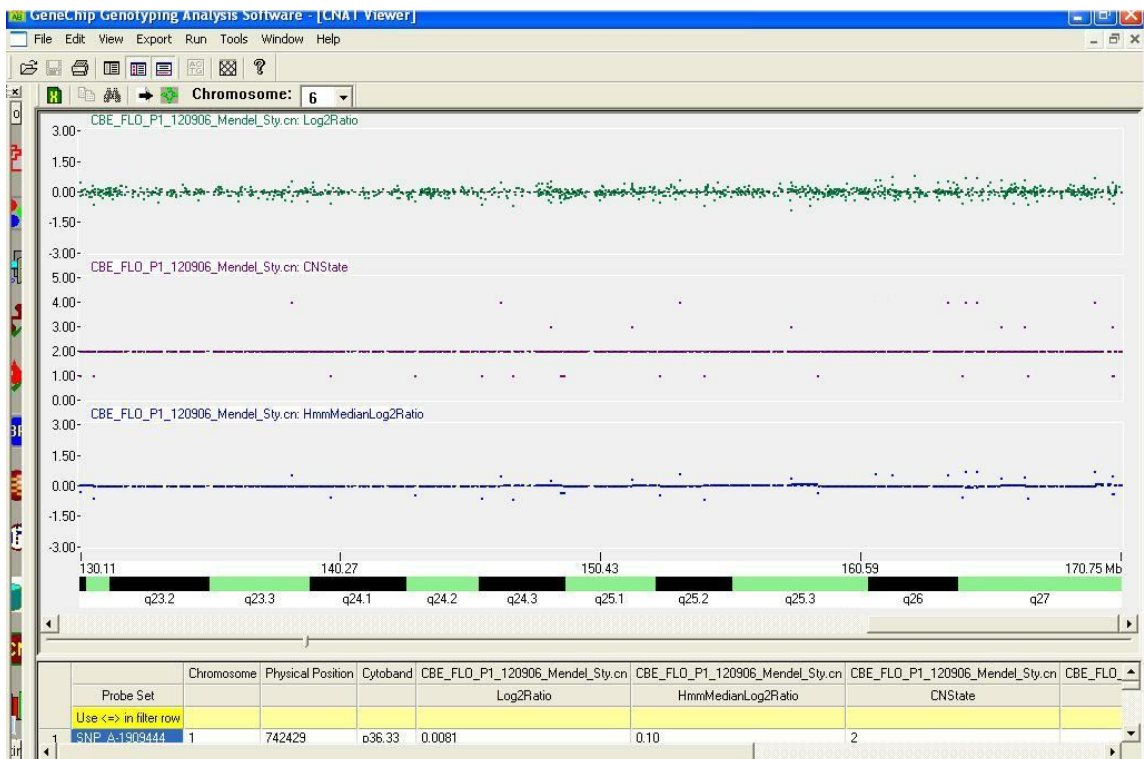


Figura 36. Detalle del estudio de CNV del gen PARKIN (paciente VI-3, familia 2).



Figura 37. Detalle del estudio de CNV en la región 1p36 (genes PINK1 y DJ-1).

DISCUSION

7. DISCUSION.

7.1. ESTUDIOS DE AGREGADOS FAMILIARES.

Las familias 1, 2 y 4 descritas en el presente trabajo, representan una nueva forma de Enfermedad de Parkinson autosómico recesivo de inicio tardío. Este hecho supone un hallazgo opuesto a lo descrito previamente respecto a las formas autosómico recesivas de la enfermedad, caracterizadas fundamentalmente por un inicio precoz (Bonifati et al., 2005; Klein et al., 2003), con excepción de unas pocas familias con similar patrón a las descritas (Valente et al., 2004a).

Los datos clínicos de los casos descritos, son similares a los de las formas idiopáticas de EP de inicio tardío, al igual que su respuesta al tratamiento dopaminérgico.

El estudio mediante neuroimagen funcional, yodine-123-betaIoflupane SPECT (Datscan®, GE) (Catafau and Tolosa, 2004), demuestra la degeneración de la vía nigroestriatal, al igual que en las formas idiopáticas de inicio tardío, con el gradiente anteroposterior típico debido a una pérdida preferencial de las células dopaminérgicas de la pars compacta de la *substantia nigra* que se proyecta al putamen posterior más que al caudado. Debemos puntualizar que la presencia de una densidad reducida de receptores dopaminérgicos postsinápticos en el caso III-1 (familia 1) no es concordante con los casos de EP idiopática. Este paciente estaba recibiendo tratamiento con agonistas dopaminérgicos que había discontinuado solo 48 horas previo al SPECT. Este período se considera demasiado corto como para revertir la posible regulación a la baja de los receptores D2 dopaminérgicos.

7.2. ANALISIS DE SEGREGACION COMPLEJA.

El ASC permite conocer cual es el modelo matemático de herencia que mejor se ajusta en una familia o en un grupo de familias. Dependiendo de la información que se introduzca en el modelo es posible además conocer parámetros adicionales, como la frecuencia del gen en la población o la penetrancia de la herencia. Existen varios métodos para realizar un análisis de segregación compleja. El empleado es el propuesto por *Lalouel et al* en 1983 (Lalouel et al., 1983).

En el estudio propuesto la utilidad fundamental radica en determinar el mejor modelo de herencia al que se ajusta nuestros agregados familiares. No se ha podido concluir la existencia de un modelo de transmisión único, ya que no ha podido ser rechazado ninguno, inclusive la no transmisibilidad, o efecto cohorte (modelo 1). Ello se explica porque en el estudio se han incluido solamente un total de 7 familias nucleares y, a pesar de que en el “Pointer” desconocemos el mínimo tamaño muestral necesario para alcanzar un grado de potencia estadística deseable a la hora de estudiar los agregados familiares, las familias sometidas a ASC son muy reducidas para obtener conclusiones adecuadas. Así mismo, otra de las limitaciones del ASC es la imposibilidad para distinguir el efecto de un único locus que subyace a un rasgo del efecto de dos o más loci actuando de forma independiente con similares patrones de transmisión (Gail Pairitz J., 1998). Los que sí nos muestran los resultados es la presencia de interacciones epistáticas, ya que t_2 (modelo general) es inferior a 0.5, por lo que deben existir otros genes interactuando además del candidato.

Sin embargo, el análisis nos ofrece la frecuencia del gen candidato en caso de ser encontrado, que el supuesto planteado es muy reducida (0.0004) y la heredabilidad del mismo a la descendencia (60%). A su vez los resultados obtenidos respecto a valores de penetrancia, siguen un incremento adecuado a la edad que, al tratarse de una enfermedad ligada al envejecimiento, es lo esperable.

7.3.GENETICA MOLECULAR EN LA EP.

El análisis genético descrito tiene como punto de partida el poder descartar las formas genéticas autosómico recesivas descritas (más frecuentes en formas de EP familiar de inicio precoz), así como algunas autosómico dominantes (por su frecuencia estadística y geográfica). El método empleado, mapeo por homocigosidad, puede ser motivo de controversia, dado que se han descrito formas de EP que son heterocigotas para PINK (Zadikoff et al., 2006b) o PARKIN (Sun et al., 2006), así como duplicaciones (Chartier-Harlin et al., 2004;Farrer et al., 2004;Fuchs et al., 2007;Ibanez et al., 2004;Nishioka et al., 2006b), o triplicaciones (Miller et al., 2004;Singleton et al., 2004) de α -sinucleína, que condicionan un aumento de la agregabilidad de la proteína y por consiguiente la aparición de la enfermedad. Además no realizamos una secuenciación completa de todos los genes (mencionar PARKIN o PARK 8). Respecto al PARK 8 solo realizamos PCR del exón 41 donde se encuentra la mutación G2019S más conocida. No realizamos un estudio completo por varios motivos. A pesar de estudiar dos familias con aparente patrón de herencia autosómico dominante, el hecho de pertenecer a poblaciones aisladas supone una elevada probabilidad de patrón

pseudodominante dada la alta tasa de con-sanguinidad de este tipo de poblaciones, donde es más común la herencia recesiva. Además la posibilidad de realizar posteriormente un análisis de todo el genoma mediante un array de alta densidad de SNPs (Gibbs and Singleton, 2006), garantiza el estudio en profundidad de todos los genes mencionados así como de los nuevos propuestos, por lo que es asumible el margen de error inicial en el planteamiento. Es más, el método CNAT permite, una vez seleccionadas las regiones génicas de interés, realizar un estudio de deleciones, duplicaciones o triplicaciones génicas.

Otro dato a favor de la capacidad del mapeo por homocigosidad de detectar o descartar el gen causal en estas familias es que en estudios similares como el llevado a cabo en poblaciones holandesas la causa de la enfermedad es un alelo homocigoto.

7.4. CONSIDERACIONES METODOLOGICAS

Los arrays de alta densidad de SNPs (100-500 K) suponen una técnica novedosa, sencilla, útil y eficaz en la aproximación del estudio de enfermedades de herencia compleja como la EP o la Enfermedad de Alzheimer. En nuestros supuestos estudiados nos ha permitido acercarnos a regiones de interés en los cromosomas 4, 6, 7 y 8. Además nos ha información sobre la alta tasa de regiones en homocigosidad que presentan estos individuos y que no pueden ser explicadas consecuencia del azar o lo que es sinónimo por estado (denominado IBS: *identity by state*), sino consecuencia de una alta tasa de con-sanguinidad (por IBD: *identity by descent*), por lo que los hace buenos candidatos a estudios de este tipo. Para ello es preciso que los agregados estudiados cumplan unos requisitos fundamentales. En primer lugar, que pertenezcan a un área geográfica teóricamente aislada geográficamente, donde haya alta tasa de co-sanguinidad y que los casos elegidos no estén muy relacionados por parentesco, en cuyo caso podrían compartir amplias regiones del genoma que no serían indicativas de una posible mutación transmitida desde un ancestro común (efecto fundador).

El método analítico empleado, para concluir lo dicho previamente, PLINK cuya vigencia es de escaso tiempo, permite el análisis de los datos obtenidos del array de tal manera que mediante mapeo por homocigosidad (cluster en homocigosidad con N SNPs compartidos) y de esta manera rastrear todo el genoma y pre-seleccionar amplias zonas compartidas, cuya explicación no es posible atribuir al azar, tras comprobar mediante simulación la inexistencia de ese solapamiento en otros individuos empleados como controles.

Igualmente el empleo de CNAT para el análisis de array nos permite disponer, de forma novedosa y reciente, de los mapas genéticos de haplotipos de todo el genoma humano y supone un punto de partida y una guía indiscutible en el estudio de enfermedades de herencia compleja. La

identificación y detección de los cambios en el número de copias es un objetivo a considerar de vital importancia, tanto por su utilidad como por lo novedoso que es. No existen estudios previos sobre la utilidad de esta técnica en enfermedades neurodegenerativas.

Por tanto, los arrays de alta resolución de todo el genoma humano están cambiando el paradigma de detección de anomalías cromosómicas e implica un nuevo objetivo para los investigadores que deberán considerar y analizar las alteraciones en el número de copias, la pérdida de heterocigosidad y el genotipo en un único experimento.

7.5.BIOLOGIA DE LOS GENES LOCALIZADOS.

En la tabla 7 se describen los genes localizados en las regiones de interés descritas previamente en los resultados del PLINK.

CLUSTERS PACIENTES	CH R	GEN/ PROTEINA	FUNCIÓN
V-1 y V-5, familia 1 VI-3, familia 2	6	PTPRK (<i>Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor</i>)	Regulación de los procesos implicados en las conexiones intercelulares y adhesión tales como control del crecimiento, invasión tumoral y metástasis. Formas complejas con beta-catenina y gamma-catenina/plakoglobina. Beta-catenina puede ser un sustrato para la actividad catalítica de PTP-kappa.
V-1 y V-5, familia 1 VI-3, familia 2	4	-	-
II-1 familia 4a y II-3 familia 4b	8	ASPH_HUMAN (<i>Aspartate beta-hydroxylase</i>)	Especialmente actividad hidroxilasa de los residuos Asp o Asn en ciertos dominios de factores de crecimiento epidérmico-like (EGF) de un número de proteínas.
		RLBP1L1 (<i>retinaldehyde binding protein 1-like 1</i>)	Dominio de union a lípidos Sec14p-like. Se encuentra en proteínas secretoras, tales como <i>S. cerevisiae phosphatidylinositol transfer protein</i> (Sec14p), y en la regulación lipídica de proteínas como RhoGAPs, RhoGEFs y neurofibromina (NF1).
II-1 familia 4a y II-3 familia 4b	8	SNTG1_HUMAN (<i>Gamma-1-syntrophin</i>)	Proteína adaptadora que se une y probablemente organiza la localización subcelular de una variedad de proteínas. Puede unir varios receptors al citoesqueleto de actina y al complejo distrofina-glicoproteína. Puede participar en la regulación de la localización subcelular de <i>diacylglycerol kinase-zeta</i> que asegura que el diacilglicerol es rápidamente inactivado seguido de la activación del receptor.
		PXDNL peroxidasin homolog (Drosophila)-like	Actividad peroxidasa (procesos biológicos desconocidos).
II-1 familia 4a y II-3 familia 4b	8	ACHA6_HUMAN (Neuronal acetylcholine	Después de unirse a la acetilcolina, el AChR responde mediante un cambio extenso en la conformación que afecta a todas las subunidades y conduce a una apertura del canal de conducción iónica a través de la

	receptor subunit membrana plasmática. alpha-6 precursor)	
	THAPI_HUMAN (THAP domain-containing protein 1)	Proteína pro-apoptótica que potencia tanto la unión en suero como la inducción de apoptosis por TNF.
	POTE8_HUMAN (Prostate, ovary, testis-expressed protein on chromosome 8)	-
	RN170_HUMAN (RING finger protein 170)	-
	HOOK3_HUMAN (Hook homolog 3)	Probable proteína de ligamiento citoesquelético, que está implicada en el ensamblaje del aparato de Golgi al citoesqueleto. Participa en la deficiencia de la arquitectura y localización del aparato de Golgi. Probablemente sirve como una Diana de la proteína spiC perteneciente a <i>Salmonella typhimurium</i> , que la inactiva, lo cual conduce a una profunda alteración en el tráfico celular.
	PFTA_HUMAN (Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha)	Cataliza la transferencia de <i>farnesyl or geranyl-geranyl moiety</i> de farnesyl o geranyl-geranyl pirofosfatasa a cisteína en la cuarta posición del C-terminal de múltiples proteínas que poseen un extremo C-terminal con la secuencia <i>Cys-aliphatic-aliphatic-X</i> . La subunidad alpha se cree que participa en un complejo estable con el sustrato. La subunidad beta se une al sustrato peptídico.
	SG196_HUMAN (Protein kinase-like protein SgK196)	Proteína de membrana. Función biológica desconocida.
	HGNAT_HUMAN (Heparan-alpha-glucosaminidase N-acetyltransferase)	Acetiltransferasa lisosomal que acetila el residuo alfa-glucosamino no reducido de la heparina o heparan-sulfato intralisosomal, convirtiéndolo en sustrato por alpha-N-acetil glucosaminidasa luminal.
II-1 familia 4a y II-3 7 familia 4b	ORC5_HUMAN (Origin recognition complex subunit 5)	Componente del complejo de reconocimiento de origen (ORC) que une orígenes de replicación. Este posee un papel tanto en la replicación cromosómica como en el tipo de ligando de silencio transcripcional. Se une a la secuencia de consenso ARS (ACS) de origen de replicación en una manera ATP-dependiente.
	LHPL3_HUMAN (Lipoma HMGIC fusion partner-like 3 protein)	Proteína de membrana. Función biológica desconocida.
	RELN_HUMAN (Reelin precursor)	Serina proteasa de matriz extracelular que juega un papel en la formación de capas celulares en el córtex cerebral y cerebelo. Regula la función de los microtúbulos en las neuronas y la migración neuronal. Afecta la migración de neuronas simpáticas pregangliónicas en la médula espinal, donde parece que actúa como una barrera de la migración neuronal. La actividad enzimática es importante para la modulación de la adhesión celular. Se une a dominios extracelulares de los receptores lipoproteicos VLDLR y ApoER2 induciendo una tirosina-fosforilación de Dab1 y modulando la fosforilación de Tau (por similitud).

Tabla 7. Genes encontrados y su función descrita.

7.6 PERSPECTIVAS FUTURAS.

Desde el punto de vista de la epidemiología, las enfermedades genéticas presentan una baja prevalencia, siendo el constituyente principal del grupo llamado de trastornos huérfanos. Sin embargo la genética constituye una de las disciplinas de mayor desarrollo en estos años. La causa de esta contradicción es que lo anterior se refiere a las enfermedades de herencia Mendeliana, producidas por una única mutación, que una vez presente causa la enfermedad. Sin embargo, existen otras enfermedades con una influencia genética menos evidente, que no sigue las leyes de la herencia Mendeliana (herencia autosómica o ligada al X, dominante o recesiva). Son las llamadas enfermedades complejas, que además son extraordinariamente frecuentes, constituyendo uno de los principales problemas de la Salud Pública en el momento actual. El ejemplo prototípico de lo anterior es la EP, en la que existiendo una indudable influencia genética, los casos de herencia mendeliana, producidas por mutaciones en el gen de sinucleína, parkin, etc., solo explican el 5%. Se comprende entonces que el descubrimiento de los genes implicados en el resto de los casos tiene una importancia fundamental. El hecho de que el efecto de estos genes no sea fácil de evidenciar se debe a múltiples factores, que explican el nombre de herencia compleja que se les atribuye. Estos factores incluyen la penetrancia reducida, la necesidad de contacto con un agente ambiental para que aparezca la clínica, la heterogeneidad genética (varios genes pueden causar la misma enfermedad), el pleiotropismo (la misma mutación produce diferentes manifestaciones clínicas) y la epístasis (el efecto de un gen depende de la acción de otros genes). Se entiende la dificultad de ver el efecto de un gen si su penetrancia es muy reducida o si la misma mutación puede originar enfermedad de Parkinson en unos casos o de Alzheimer en otros. En caso de existir una influencia ambiental marcada ésta puede ser en un sentido u el contrario. Ejemplo de esto puede ser un efecto beneficioso del ejercicio o la dieta, que haga que la enfermedad solo se manifieste en ausencia de esto, o por el contrario, que sea necesario el contacto con un factor para que aparezca la enfermedad (ej. Insecticidas y enfermedad de Parkinson, en individuos acetiladores lentos).

La metodología para discernir el efecto genético de enfermedades complejas incluye los estudios de agregación familiar, los estudios de gemelaridad y los estudios de adopción. Los estudios de agregación familiar consisten en examinar si la enfermedad es más frecuente en individuos de la misma familia o no. Sin embargo, la agregación familiar puede indicar contacto con una noxa común, incluso en los primeros años de vida. Aproximaciones para discernir este efecto, son el examen de la edad de aparición del proceso (aparición a la misma edad indica causa

genética, mientras que aparición a edad diferente pero en un periodo de tiempo similar indica causa ambiental), examen de individuos en varias generaciones, examen de adoptados y examen de sujetos de la misma familia nacidos en diferentes poblaciones. Los estudios de generalidad consisten en el examen de la aparición de un trastorno en gemelos monozigóticos, respecto a gemelos dizigóticos. Como ambos tipos de gemelos comparten el mismo ambiente, la diferencia entre concordancia entre uno u otro tipo se deberá a influencias genéticas.

Por causa de los factores enunciados previamente se deduce que la realización de estudios de análisis de ligamiento para conocer los genes implicados en enfermedades de herencia compleja es más complicado en las enfermedades de herencia Mendeliana. A la reducida penetrancia, que dificulta conocer el estado de afectado o no, la heterogeneidad genética, que hace que puedan estudiarse individuos con enfermedades producidas por genes diferentes o la epístasis, se añaden otros factores que complican aún más estos estudios como son la existencia de fenocopias en la misma familia (sujetos con la misma enfermedad pero de causa ambiental, dado que se trata de enfermedades muy comunes) o que al ser enfermedades de aparición tardía muchos individuos afectados estén muertos y sin posibilidad de acceso a su DNA para estudiar marcadores polimórficos. Por todo ello, los estudios sobre enfermedades complejas, a pesar de su utilidad, son extraordinariamente complicados y los resultados hasta ahora son todavía escasos.

El enorme desarrollo de la Genética Molecular está permitiendo conocer con detalle cual es la causa genética del trastorno. En este sentido los microarrays de SNPs son posiblemente la herramienta de estudio genético más potente de la que disponemos en la actualidad y nos van a permitir estudiar casos que hasta la fecha no podían ser examinados por la complejidad de la estructura familiar como es el caso de la familia 1-2. Nuestro trabajo ha mostrado como un cuidadoso estudio genético y un seguimiento prolongado de los pacientes con EP es capaz de determinar el origen genético de un trastorno aparentemente de causa esporádica.

CONCLUSIONES

8.CONCLUSIONES.

1. Las formas clínicas de Enfermedad de Parkinson familiar autosómico recesivo de inicio tardío, clínicamente benignas, existen en la población general.
2. Estas formas clínicas son aparentemente esporádicas, pero mediante un estudio detallado se objetiva una herencia autosómica.
3. El análisis de segregación compleja no es aplicable al estudio de familias con herencia compleja como las que aquí se presentan, ya que no tiene en cuenta fenómenos como los patrones pseudodominantes. Entre las razones causales podemos añadir las propias limitaciones del ASC (se desconoce el mínimo n para alcanzar potencia estadística). Por ello no podemos conocer mediante ASC que el tipo de herencia de estas familias.
4. Los arrays de alta densidad de SNPs constituyen una herramienta sencilla y rápida para examinar desde el punto de vista genético-molecular familias con enfermedades neurológicas de herencia compleja entre las cuales está la Enfermedad de Parkinson.
5. El estudio por homociguidad con arrays con alta densidad permite la localización de genes en familias con herencia recesiva en las cuales no es posible realizar el análisis de ligamiento clásico.
6. El análisis de la variabilidad en el número de copias génicas (duplicaciones, deleciones, triplicaciones) mediante arrays de alta densidad permite descartar la implicación de los genes recesivos conocidos (PINK1, DJ1 y PARKIN).
7. Los arrays de SNPs de alta densidad constituyen la herramienta de estudio más útil actualmente para evaluar formas familiares de EP de herencia compleja.

ENGLISH SUMMARY

9. ENGLISH SUMMARY.

9.1. INTRODUCTION.

Idiopathic Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease, manifested clinically by tremor, slowness of movement (bradykinesia) and rigidity. Degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) is the neuropathology substrate. Incidence of PD is 16-19/100.000/year, and peaks between 60-65 years of age. It is estimated that the lifetime risk of developing PD is 2 percent for men and 1.3 percent for women (Elbaz et al., 2002). Male preponderance is also observed in other studies with respect to prevalence and incidence rates (Fall et al., 1996; Kuopio et al., 1999; Mayeux et al., 1995). While the etiology of PD is poorly understood the explanation for the increased risk of PD in male subjects is also unknown.

There is much controversy about the role of genetics in the etiology of Parkinson's disease (PD). The causative genes described so far have improved the knowledge of pathogenesis of the disease and indeed give opportunity for new therapeutic approaches.

We know nowadays that in most cases PD is a complex disease and both genetic and environmental factors contribute to susceptibility, but a clear cause and mechanisms which underlie pathogenesis of the disease are still unknown. At the end of the ninetieth century, Gowers (1886) pointed out that in PD "...in any occasions the influence of the inheritance could be important...". This was the general opinion among researchers till 1980, mainly based on Mjones (1949) studies and the single cases reported in literature. In 1980, following twin concordance studies that began to appear, and the observation that the toxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) could cause nigrostriatal dopaminergic degeneration and parkinsonism, the pathogenesis theories focused in environmental agents as a risk factors for PD (Nicklas and Heikkilä 1985). Barbeau (1985) suggested that PD might be the result of a complex interrelation between environmental factors in individuals with a genetically susceptibility, influenced by neuronal aging. Similar mechanisms can be the cause of other diseases linked to aging, as for example Alzheimer's disease. Environmental factors, that could be contributing as a risk or protective factors are infections (risk factor) (Wetmur et al., 1979), tobacco (protective factor) (Barbeau et al., 1986; Baumann et al., 1980; Bharucha et al., 1986; Godwin-Austen et al., 1982; Golbe et al., 1986; Kessler and Diamond, 1971; Kondo, 1987; Nefzger et al., 1968; Rajput et

al., 1987;Ward et al., 1983), pesticide exposure (risk factor) (Nicklas et al., 1985), head trauma (risk factor) (Betarbet et al., 2000;Taylor et al., 1999) and intake of coffee or caffeine (decreased risk) (Gorell et al., 1999;Tanner et al., 2002;Tzourio et al., 1997).

Focusing on genetics, it has become the most important field for researching the pathogenesis of the disease. The knowledge of genes involved in familiar forms of neurological disorders can provide us of a better understanding of the pathophysiology of the disease and generate targets for new therapeutic approaches. Uncontrolled studies have demonstrated that 13 to 27.5 percent of patients with PD reported having an affected first-or second-degree relative and 10 to 16 percent report having an affected first-degree relative. However, the mode of inheritance in most PD families is unknown. As in other neurological disorders Mendelian forms, although uncommon, has been reported. The identification of several genes (α -synuclein, PARKIN, UCH-L1, DJ-1, PINK 1, LRRK2) and loci in familial PD along with experimental studies have afforded new information of the pathogenesis of this disease. There is also growing evidence that mitochondrial respiratory chain dysfunction may play a role in degenerative processes in PD. Complex I defect in PD is well established, but the mechanisms leading to it remain to be determined. It has been suggested that mitochondrial DNA (mtDNA) mutations are responsible for many sporadic cases of PD (Parker and Swerdlow, 1998). There is some experimental evidence that a mtDNA abnormality contributes to complex I defect in PD.

There is also a remarkable geographic variation in incidence. The factors responsible for geographic variation in the occurrence of PD are unknown, but mainly environmental factors have been suggested (Zhang et al., 2003). The genetic component in PD is an alternative explanation which is supported by the 18 reported higher age-adjusted prevalence of PD among Caucasians and Hispanics than among African Americans in the US population.

9.2.PATHOLOGICAL AND CLINICAL FEATURES.

Neuropathological hallmarks of the disease are selective degeneration of dopaminergic neurons in *substantia nigra* pars compacta and formation of fibrillary intracytoplasmic inclusions, the Lewy bodies, in remaining neurones. Immunocytochemical studies performed with monoclonal antibodies to α -synuclein have shown that the α -synuclein is a component of Lewy bodies (Baba et al., 1998). Lewy bodies are also present in other prediction sites than SN, especially nucleus basalis of Meynert, dorsal motor nucleus of vagus, hypothalamus, and locus

coeruleus (Duffy P and Tennyson.VM., 1965;Forno and Norville, 1981;Gibb, 1992;Jellinger, 1987). There is also an increase in presence of these markers in systematic autopsies made to aged, non-parkinsonian population. They are present in 1 percent of sixty year-old people and between 6-10 percent of eighty or more year-old population (Alvord, Jr. et al., 1974;Jellinger, 1987). The meaning of these marks in clinically healthy people is not well known but they might be pointing out subclinical forms. Neuronal cell loss is already advanced when diagnosis is made, since it has been estimated that by the time of symptoms appear, striatal dopamine levels have decreased by 80 percent (Bernheimer et al., 1973).

Parkinsonism or Parkinsonian syndromes are the terms used for a clinical disorder characterized by at least two of the following motor manifestations: tremor, muscular rigidity and bradykinesia. Idiopathic PD accounts for approximately 85 percent of all cases with parkinsonism. PD is progressive and usually has an insidious onset in mid to late adulthood. The diagnosis of PD is primarily clinical based on the presence of typical motor manifestations and exclusion of other conditions causing parkinsonism. The most widely used criteria for PD are those of the United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria (Daniel and Lees, 1993). It has been shown that only about 75 percent of clinical diagnoses of PD are confirmed at autopsy (Hughes et al., 1992;Rajput et al., 1991). This is largely explained by the fact that cardinal signs of parkinsonism also occurs in other disorders such as dementia with Lewy bodies (DLB), parkinsonism caused by vascular degeneration with lacunar infarcts in basal brain, neuroleptic drugs and atypical parkinsonism in progressive supranuclear palsy (PSP), multiple system atrophy (MSA), and corticobasal degeneration (CBD). These disorders most likely result from loss or dysfunction of the dopaminergic neurons in the SN, but may or may not have Lewy bodies on pathology.

9.3.GENETICS OF PARKINSON'S DISEASE.

9.3.1.GENETIC EPIDEMIOLOGY.

Opinion about the importance of genetic factors in PD has swung through out the years since the initial description. As has been related above, the first theories about etiology of PD pointed out to a genetic origin. The first extensive genetic study was carried out by Mj6nes in Sweden in 1949, who reviewed of a series of families with multiple affected individuals and concluded that there must be an autosomal dominant pattern of inheritance with a penetrance about

60 percent. Although with many methodological problems, this study set the basis of the modern concept of genetics of PD. Between 1982 and 1984 many authors published several families with PD and pointed to a genetic origin of PD (Barbeau et al., 1984; Barbeau and Pourcher, 1982).

Using multivariate statistical methods, a positive family history of PD has been shown to be the strongest risk factor for the disease (Preux et al., 2000). Uncontrolled studies have demonstrated that 13 to 27.5 percent of patients with PD reported having an affected first- or second-degree relative and 10 to 16 percent of patients with PD reported having an affected first-degree relative (Lazzarini et al., 1994). It was estimated that the cumulative risk of PD by the age 90 may exceed 50 percent in probands' siblings when a parent is also affected. A two- to threefold increased risk of PD in first-degree relatives of affected individuals compared with first-degree relatives of unaffected individuals has been found in all these studies. Higher risks for familial PD (OR 7.1-14.6) were found in other case-control studies in Italy (DeMichele G. et al., 1996) and in Germany (Viergge, 1994), but the inclusion of first- and second-degree relatives and patients of movement disorders clinics may account for these results.

The familial clustering of PD seems to be stronger for early-onset PD compared with late-onset disease. An interesting study established that the age specific risk of PD is increased eightfold among relatives of patients with early-onset disease and threefold among relatives of late-onset disease (Payami et al., 2002).

Twin studies do not support the existence of a genetic factor in the etiology of PD, since concordance rates for monozygotic twins (MZ) are not higher than concordance rates for dizygotic pairs (DZ) (Duvoisin et al., 1981; Tanner et al., 1999). However, in a subset of twins with PD at or before age 50 years in at least 1 twin, MZ concordance is 1.0 and DZ concordance is 0.167, suggesting that genetic factors are important in early-onset forms of the disease, but not in late-ones.

Nevertheless, it is important to draw attention to the limitations of twin studies on PD. These studies are cross-sectional, with the exception of the study of Viergge et al, so they can not circumvent a major problem in twin studies of PD, the possible presence of a subclinical PD, and therefore may underestimate MZ concordance for the disease if PD may develop later in the second twin, or the second twin may die of another cause before the onset of symptoms. This is the reason why concordance in MZ pairs increases with time.

In the 1990s, when familial cases were studied with Molecular Genetics techniques, and disease causative genes cloned, PD began to behave similarly to other diseases with complex inheritance, with uncommon cases secondary to monogenic disease exhibiting a dominant or recessive pattern of inheritance, and very frequent cases with familial aggregation but not Mendelian pattern, secondary to a polygenic or multifactorial trait.

Familial aggregation was recognized as a prominent characteristic of many neurodegenerative disorders decades ago. After the molecular genetic (Martin, 1999) and biochemical properties of these diseases have been unravelled, one of their characteristics which has emerged is the dichotomy between familial (rare) and seemingly non-familial (common) forms (sporadic or idiopathic) that is present in the genetic epidemiology of neurodegenerative diseases. Familial forms (Gail Pairitz J., 1998) have Mendelian patterns of transmission, while in seemingly sporadic forms a growing body of evidence suggests an influence of multiple genetic factors that may associate an interaction with environmental factors. In Alzheimer Disease, there are three rare fully penetrant autosomal dominant forms caused by mutations in APP (Goldgaber et al., 1987), PSEN1 (Barinaga, 1995) and PSEN2 (Levy-Lahad et al., 1995) genes, and a common incompletely penetrant susceptibility variant, namely, the $\epsilon 4$ allele in APOE gene (Chartier-Harlin et al., 1994), that significantly increases the risk by lowering the age of onset (AO) of the disease (Bertram and Tanzi, 2005).

Familial aggregation in a disease does not necessarily imply a genetic etiology. When familial cases appear, genetic and environmental factors may be influencing the observed pattern of disease transmission in families. The genetic factors may be Mendelian with any mode of inheritance, polygenic, or any mixture of these ones. Various methods have been proposed for the statistical inference of gene effects in familial data. When examining a family with a certain disease present in several members, the issue is whether a genetic component or an environmental factor is primarily responsible for the trait. The simplest way to determine the genetic contribution to a trait is examining the recurrence risk ratios. The most popular is due to Risch (Risch, 1990) and is defined by

$$\lambda_R = k_R/k$$

where R denotes the relationship with the proband, k_R is the prevalence in relatives of type R , and k is the prevalence in the general population. In any genetic model

$$1 \leq \lambda_I \leq \lambda_s \leq \lambda_M$$

where M , s and 1 are relationship subscripts that denote MZ twins, siblings and parents (or offspring) respectively. Typically, λ_R is calculated for siblings and λ_s is known as the *sibling relative risk*. Examples of λ_s for different diseases include Huntington's disease (where $k_s = 0.5$, $k = 0.0001$, and so $\lambda_s \approx 5,000$), recessive CMT (where $k_s = 0.25$, $k = 0.004$, and so $\lambda_s \approx 500$) and Parkinson's disease (where $k_s = 0.3$, $k = 0.1$, and so $\lambda_s = 3$). In general, the greater the value of λ_s , the greater the genetic influence on the trait. However, in itself, λ_s is not necessarily a reliable parameter for estimating the power of a proposed linkage study. For example, in some two locus models a λ_s as high as 10 does not guarantee that underlying genes will be easily mapped by linkage studies.

The power to detect genetic influence of a variant can also be defined in terms of *genotype relative risks* (*GRR's*) (Schaid and Sommer, 1993). Consider a biallelic locus with alleles of type A , a and relative frequencies $f(A)$, $f(a)$, where A is the disease susceptibility allele.

The conditional probabilities that an individual with a particular genotype has a disease D are known as *penetrance* parameters and given by

$$f_{AA} = P(D/AA), f_{Aa} = P(D/Aa), f_{aa} = P(D/aa)$$

The genotype relative risks for D at this locus are

$$g_1 = f_{Aa}/f_{aa}, g_2 = f_{AA}/f_{aa}$$

The relationship between the sibling relative risk ratio and genotype relative risks depends on both allele frequency and mode of inheritance (Rybicki and Elston, 2000) Explicit formulae relating *GRR* and λ_s for a dominant, recessive, additive and multiplicative models can be found in Wittke-Thompson et al. (Wittke-Thompson et al., 2005).

When discussing the heritability of a trait is worth to consider that there are two different measures that may be both referred to as heritability (Abney et al., 2001). Heritability in the broad sense (denoted H^2) is defined as the proportion of total variance in a trait that is due to all genetic components (additive, dominance and epistatic), while narrow heritability (denoted h^2) is defined as the proportion of phenotypic variance that can be attributed to additive genetic variance. The additive genetic variance at a locus measures the variance due to the mean effects of single alleles. Dominance variance of a trait at a locus measures the variance due to the interaction of alleles that constitute a genotype. Epistatic variance is due to the interaction effect between loci. Total additive (respectively, dominance) variance is the additive (respectively, dominance) variance at each locus summed over the genome. Similarly, total epistatic variance is the total variance

obtained by summing the contribution of epistatic variance of all pairs of loci over the genome. Typically, one assumes that the additive effects are the primary contributors to the trait. A heritability score near zero suggests that almost all variation is due to environmental causes, whereas a heritability score near 1 implies that almost all variation is due to genetic factors.

It is important to bear in mind that heritability is a ratio and as such does not necessarily provide an accurate measure of how important genes are in determining the phenotype. Heritability reflects the proportion of total variation due to a gene variant, reflecting both the variant's frequency in the population and the size of the effects that the gene variant causes and is primarily used for assessing the genetic contribution to a quantitative trait. Sibling relative risk, on the other hand, assesses the increased disease risk to siblings that share one-half of their genes with affected probands and is used in connection with qualitative traits. For a fixed value of λ_R the corresponding heritability decreases with decreasing population prevalence (Risch, 2001).

A major point when considering the heritability of a tract is the evaluation of the segregation pattern. Simple segregation analysis considers the proportion of affected and not affected in the offspring and examines this proportion against the theoretical proportion of autosomal dominant (50%) or recessive (25% of affected/75% of non-affected, in the simplest case) and considering the confidence intervals discloses whether a particular mode of transmission is possible or can be rejected. A more general method for evaluating the transmission of a trait within pedigrees is complex segregation analysis (CSA), which test the fitting of the inheritance of the trait to different models, genetic and non genetic, allowing to select the model that obtain better fitting of the data. Whilst simple segregation analysis only evaluates whether the proportion of affected and unaffected offspring in families is consistent with Mendelian expectations, CSA can consider more complicated patterns of transmission and environmental perturbations. CSA can be applied to any pedigree structure and works with both qualitative and quantitative traits.

The parameters estimated in CSA are: 1) an underlying discrete risk trait (that may be present in double dose (AA), one dose (Aa) or absent (aa) that influences a given individual's age-dependent risk for disease (in genetic models, this trait represents a high-risk allele, whereas in non-genetic models, the trait is interpreted more generally as levels of exposure to an unmeasured major environmental risk factor); 2) the transmission parameters which represent the probability that a parent transmits the risk trait to an offspring; and 3) the penetrance of the risk trait. CSA can also be used to further define the genetic features of a trait, such as the high risk allele frequency in the population. In addition, it can be used to evaluate etiologic heterogeneity in a trait, either by doing CSA in defined subsets or by contrasting the likelihoods under competing models for each family.

The mixed model, which is the one we have used here (another possibility for CSA is a regressive logistic model for disease (Bonney, 1986)) assumes that the liability to the disease (x) can be described by an underlying continuous liability scale in which a diallelic single major locus (g), a polygenic component (c), and environmental effects (e) operate independently. The liability (x) is then defined as $x=g+c+e$. The respective variances of these parameters are denoted as $V=G+C+E$. The relative contribution of the polygenic component is defined by H , the heritability, which reflects genetic transmission not ascribed to a major gene or cultural transmission ($H=C/V$).

Model parameters in the mixed model are:

A major locus has two alleles (A,a), whose genotype frequencies have to follow the Hardy-Weinberg equilibrium.

q , the frequency of the high risk allele A ;

t , the genetic distance or displacement at the single major locus measured in standard deviations on the liability scale between the two homozygous genotypes (AA and aa);

d , degree of dominance at the major locus obtained by the equation $d= (\mu_{Aa}- \mu_{aa}) / (\mu_{AA}- \mu_{aa})$, such that $d = 0$ corresponds to a recessive gene, $d = 1$ corresponds to a dominant gene, $0 < d < 1$ corresponds to some degree of additivity and $d =0.5$ is referred to as codominant;

H the polygenic heritability in the children (k); $H=C_k/V$

Z , the ratio of adult to childhood heritability; $Z=C_a/C_k$

and t_1 , t_2 and t_3 , the respective probabilities that genotypes AA , Aa , and aa transmit the allele A .

The general model contains the most parameters. This model is then compared with a Mendelian transmission model, an environmental transmission model, and a polygenic model. Under a Mendelian model, the transmission probabilities, namely, the probabilities that the AA , Aa , and aa genotypes will pass on an A allele, do not significantly differ from the Mendelian expectations of 1, 0.5, and 0, respectively, whereas in the general model these transmission probabilities can take any value. Under the environmental model, these probabilities are all equal because the phenotypic mode that a child is in is unrelated to the mode that the parent is in. Whilst the Mendelian and environmental models can contain multiple small genetic and environmental effects, a polygenic model considers only the multiple small genetic effects so it has no large deviation in the trait caused by either a major locus or the environment. Having a Mendelian model favoured in a data set, dominant and recessive Mendelian submodels can be evaluated.

There are several software packages that can perform CSA: PAP (Hasstedt S, Cartwright P (1981) PAP: pedigree analysis package. Department of Medical Biophysics and Computing, University of Utah, Salt Lake City), SAGE Case Western Reserve University Statistical Analysis for Genetic Epidemiology at <http://darwin.cwru.edu/sage/>), GAP genetic analysis package (from Epicenter Software, web: <http://icarus2.hsc.usc.edu/epicenter/gap.html>) and POINTER. (<ftp://cedar.genetics.soton.ac.uk/pub/PROGRAMS/pointer/>). This variety of software aimed to do CSA perform a maximum likelihood analysis to find the combination of the parameter listed above values which gives the largest overall likelihood for the observed data. Within the variety of models considered, it proceeds usually by testing a general non-restricted model, which contain the maximum parameters that is fitted to the data and will give the best fit models of varying degrees of generality, both to determine whether a Mendelian locus is likely to exert a large effect on the phenotype of interest and to estimate the magnitude of genetic sources of variation in the trait (Gail Pairitz J., 1998). This model is then compared with restricted models such as the Mendelian transmission models (Mendelian dominant, Mendelian recessive and Mendelian co-dominant), the environmental transmission model, and the polygenic or ‘no major gene model’. This is accomplished by testing the genetic hypotheses by keeping the relevant parameters from d , t , q , and H constant, whereas the remaining parameters are estimated by maximizing the likelihood of the phenotypes in the families.

Mendelian models assume a major locus with two alleles that act either in a dominant, co-dominant or recessive fashion. The ‘no major gene’ model assumes that the baseline risk is not influenced by the risk trait (i.e. all persons have the same specific risk of disease). The environmental model assumes that an individual’s phenotype depends on his or her environmental exposures and is independent of the phenotype of the parents. There are two parameters to test multifactorial heritability. The parameter H represents polygenic heritability in the offspring, where $H=C_k/V$, in which C_k is the multifactorial component and V is the overall variance. The second parameter is Z for which H_Z represents the multifactorial heritability in parents, where $Z=C_a/C_k$, the ratio of the multifactorial component in adults and children. Significant deviation of Z from 1 suggests a generational difference in multifactorial heritability.

In segregation analysis, it is incorrect to assume that the gene frequency is constant at all ages because any gene causing specific mortality must decrease with age. Risks (R) can be determined using mortality figures that allow calculate cumulative mortalities and risk, so that the R_j , the risk attributed to the j th liability class, is

$$R_j=(I_j-M_{j-1})/(I-M_{j-1})$$

where I_j is the cumulative incidence to the mid-point and M_{j-1} is the cumulative specific mortality to the end of the preceding class.

As we pointed above, models are compared by a likelihood ratio test. The difference between the minus twice the log likelihood plus a constant ($-2\ln L+k$) calculated under a general model (with m parameters) and under a reduced model (with n parameters)

is asymptotically distributed as χ^2 with $m-n$ degrees of freedom. Another way to compare hypotheses is using the Akaike information criterion (AIC) (Akaike HA, 1974). AIC is calculated as $-2\ln L+k$ plus twice the number of free parameters in the model. The model with the lowest AIC is taken to give the best fit to the data. Comparison by means of AIC values has the advantage that one model does not have to be a subset of the other so it can be used for non-nested models.

Finally, CSA not only allows to determine whether a major gene is involved in a familial trait but also to predict the pattern of inheritance of the hypothesized gene, the penetrance and the disease allele frequency. Taking the age-specific mortality into account, (Iselius et al., 1991) defined the penetrance in gene carriers (G') as the approximate cumulative incidence for gene carriers in the j th liability class, given by the following:

$$P_j = P(\text{aff} | G', j) + [1 - P(\text{aff} | G', j)] M'_{j-1}$$

where the genotype-specific mortality

$$M'_{j-1} = \{ \Sigma P(G' | \text{aff}, i)(M_i - M_{i-1}) \} / \Sigma P(P' | \text{aff}, i) (I_i - I_{i-1})$$

The aim of our study was to assess the contribution of genetic factors in AD in an unselected large number of Spanish families, and to investigate a possible Mendelian inheritance as explanation for the reported familial aggregation of AD.

9.3.2. MOLECULAR GENETICS OF FAMILIAL PD.

In monogenic PD there are, so far, twelve familial forms displayed in the OMIM. This review will concentrate in seven of them that are better known.

The first one, PARK 1 (OMIM, [#168601](#)), was reported in 1996 in an Italo-American family with members living on both sides of the Atlantic (Golbe et al., 1996). The researches detected cases from a family in New Jersey, with autosomal dominant PD, and traced back their

origins to the Contursi village in South Italy. The genome wide screen of this extensive family, found linkage to markers on chromosome 4p21 (Polymeropoulos et al., 1996). Considering the genes located in this region, α -synuclein (SNCA) was the best candidate because this protein is present in senile plaques in Alzheimer's disease. The sequencing of this gene discovered a point mutation A53T in this kindred. Afterwards this mutation has been found in several Greek families and later one, other point mutations were reported (Polymeropoulos et al., 1997), A30P in a German family (Kruger et al., 1998), and E46K in a Spanish family with Lewy body dementia (Zarranz et al., 2004) (ver figura 1). Although SNCA is the main protein of LB, the mutations mentioned before are present only in a few families despite thorough studies in ample series of familial and sporadic PD, so they are very uncommon. The clinical phenotype of these patients bearing synuclein mutations is very similar to sporadic forms of PD, but the age of onset usually is earlier. Some patients could develop cognitive impairment and autonomic dysfunction. The neuropathological hallmarks are the same as sporadic forms.

Genomics multiplications of the whole gene have been described in familial PD linked to the 4p21 region, such as duplications (Chartier-Harlin et al., 2004; Farrer et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Ibanez et al., 2004; Nishioka et al., 2006a), or triplications (Miller et al., 2004; Singleton et al., 2004), after the autosomal dominant form named PARK 4 (OMIM, [#605543](#)) that was erroneously allocated to chromosome 4p14, in a second genomic search was linked to 4q21 region. Carriers of the triplication have four copies of SNCA. This results in an increased dosage of SNCA that is attributed as the cause of Parkinson's disease. The etiology of this form of PD is similar to that of Alzheimer's disease in Down syndrome where an overexpression of the amyloid precursor gene is present due to a chromosome 21 trisomy

The second gene described was PARKIN (PARK 2, OMIM, [#600116](#)), in Japanese families with autosomal recessive pattern of inheritance (Ishikawa and Tsuji, 1996). PARKIN is the second larger gene in human genome, with 1.3 Mb and 12 exons. There have been described more than 100 mutations (deletions, insertions, point mutations) in PARKIN. Mutations in this gene are responsible for 49% of familial cases (Lucking et al., 1998). Clinically, age of onset of the disease is very earlier, about 20 years old. They progress slowly and have a good response to L-dopa, although usually present dyskinesias. The neuropathology shows a loss of dopaminergic neurons without LB (Mori, 2005; Takahashi et al., 1994). Heterozygotic forms of PARKIN have shown LB (Farrer et al., 2001a; van de Warrenburg et al., 2001) and there are issues about the risk of late onset PD of heterozygous carriers of PARKIN mutations (Farrer et al., 2001b; Hilker et al., 2001; Klein et al., 2000). PET studies have shown that heterozygous PARKIN mutation carriers

have reduced 18F-dopa uptake, suggesting that possession of a single defective PARKIN allele causes a sub-clinical nigrostriatal dysfunction. A possible explanation for the inconstant apparition of PD in these cases is that other modulating gene or polymorphisms in the PARKIN promoter region, that may reduce the expression of PARKIN, are necessary to develop the disease in heterozygous carriers.

PARK 5 (OMIM, #191342) was identified when ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCHL1, 4p14) was screened as a candidate gene, because of its role in the degradation protein pathway throughout the ubiquitin-proteasome system. The gene was sequenced in 72 families with PD, and a *missense* mutation (I93M) was found in two German families (Leroy et al., 1998). However, there are not enough genetic data to ascertain whether this mutation is a causal mutation or a gene polymorphism. Nevertheless, the I93M point mutation causes a 50% reduction in the catalytic activity of the enzyme. Furthermore, there is a common polymorphism Y18S in the same gene, in which the variant 18S has a protective effect against developing the disease. This enzyme hydrolyzes the C-terminal of ubiquitin and produces monomers that can be recycled for the clearance of other proteins. It is one of the most abundant proteins in the brain. LB show positivity for this protein in immunofluorescence studies.

PARK 6 (OMIM, #605909) and 7 (OMIM, #606324) were identified in two European families with an autosomal recessive pattern of inheritance in loci on chromosome 1p36 only 25 cM apart. PARK 6, codifies a PTEN- induced putative kinase 1, or PINK 1 kinase (PINK 1, 1p35-36). Again the description of heterozygote cases with PD (Healy et al., 2004) raises issues of slow phenotypic forms of the disease. PARK 7 correspond to the gene DJ-1 (Nagakubo et al., 1997), in which it has been described a deletion in exon 5 and several point mutations (Bonifati et al., 2003).

PARK 8 (OMIM, #607060) was described in a Japanese family with an autosomal dominant pattern of inheritance (*the Sagami-hara Kindred*) with an early-onset PD (Funayama et al., 2002). The gene is located in chromosome 12 and codifies a leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2, 12q12), named "dardarina" (Zimprich et al., 2004a; Zimprich et al., 2004b), a Basque word for tremor. There has been described many mutations (K1114K; A211V; A419V; K544E; P755LV; M1869V; I1122V; R1441H; R1441C; R1441G; Y1699C; I2020T, I2012T; E1874Stop; I1122V; G2019S; A1442P). The most frequent mutation G2019S has been described in 41% of cases in North Africa (Lesage et al., 2005a; Lesage et al., 2005b; Lesage et al., 2006), and

2.1-11% of European families with a North-South gradient (Hsu et al., 2005; Paisan-Ruiz et al., 2005).

9.3.3. TRANSLATING GENETIC FINDINGS INTO PHYSIOPATHOLOGICAL PATHWAYS.

SNCA, the first responsible gene discovered in PD, is expressed throughout the central nervous system. In neurons, this protein is located in synaptic terminals, lipid membranes and vesicles. (Goedert, 2001; Solano et al., 2000). As it has been associated with the neuron synaptic vesicles and nucleus, it was originally named synuclein, and later α -synuclein when analogue proteins were isolated. This 140 amino acid protein contains a region with seven imperfect repeats of the peptide [E/G]-K-T-K-[E/Q]-[G/Q]-V-X-X-X-X, and three main domains: the amphiphatic region; a very hydrophobic region named NAC (from non amyloid component) because it was isolated in senile plaques; and the carboxyl terminal region. The first domain that has a very similar structure to apolipoproteins interacts with membrane lipids. By its N-terminal end it joins to the amyloid precursor protein and by its C-terminal end it joins to the tau protein, so it might function as a link between these proteins in Alzheimer's disease. Its N-terminal region also joins to synphilin a protein that may act as a nucleus in Lewy bodies formation.

α -synuclein has very different functions. It is highly expressed in song birds during neurogenesis, so it may have a role in neuronal plasticity, but probably its main role is in the regulation of the synaptic vesicles through its capability to join to lipids. α -synuclein knock-out mice do not have major manifestations, due to a functional replacement by other synucleins. However, impairment in synapses has been detected in knock-out mice, with faster recovery of the synaptic discharges after paired potentials, suggesting that α synuclein reduces synaptic discharges. Several putative functions of this protein have been reported, with a role in synaptic transmission and neuron plasticity (Abeliovich et al., 2000). The three mutations described (A30P; A53T, E46K) change the protein properties and lead it to an increase in her aggregability (Choi et al., 2004; Conway et al., 1998). A30P and A53T mutations exhibit a tendency to change α -synuclein conformation, forming oligomers that will join into protofibrils that aggregate into the fibrillar deposition of the Lewy bodies. This process is crucial in LB formation and in the molecular pathogenesis of the disease. In this regard, the neurofibrils are responsible for the lesions and the Lewy bodies may not be the toxic structure but rather a deposition that leads to a reduction of the free toxic oligomers.

Oligomerization of α -synuclein produces intermediary species (protofibrils) that form annular structures with pore-like properties that permeabilize synthetic vesicular membranes, what can cause leakage of catecholamines out of the synaptic vesicles and formation of radical species that may damage the neuron. (Conway et al., 1998;Lashuel et al., 2002;Li et al., 2001). It has been suggested that protofibrils are the toxic α -synuclein species that are responsible for cell death (Caughey and Lansbury, 2003). High levels of poorly degraded SNCA have a tendency to self-aggregate, induce aggregation of other proteins, interfere with intracellular functions, and induce cytotoxicity. Aggregates of SNCA can also induce proteasomal damage, which may account for why mutations in this protein are associated with the accumulation of a wide range of other intracellular (Bennett et al., 2005).

The second gene discovered in PD, PARKIN, is a member of the protein family ligases E3, that is expressed in cytoplasm, nucleus, Golgi apparatus and processes of neurons (Horowitz et al., 2003). They are responsible for activating ubiquitin molecule transference to the substrate. These could be damaged by S-nitrosilation as well of by excito-toxicity{Chung, 2004 4179 /id}. There are some evidence about the role of the inhibition of ubiquitin-proteasome system in the degeneration of the nigrostriatal pathway in PD {McNaught, 2001 9371 /id}. PARK 5 (UCH-L1) plays a role in a degradation protein pathway throughout the ubiquitin-proteasome system as well. It is one of the most abundant proteins in brain (Solano et al., 2000), and constitutes 1 to 2% of soluble proteins in the brain (Wilkinson et al., 1989;Wilkinson et al., 1992), and LB are positive for this protein in immunofluorescence studies . Parkin protein has a structure with an ubiquitin homolog region and two RING-finger regions, with a configuration similar to the ubiquitin ligases. It is involved in the pathogenesis of the disease through the ubiquitination and degradation of proteins by the 26-proteasome. This pathway is very commonly used to remove denaturalized proteins or regulate normal proteins through degradation, by tagging them with a chain of ubiquitins that instructs them to enter the 26-proteasome pathway where they are degraded to smaller peptides. This process has several steps: activation of the ubiquitin by the E1; conjugation of the activated ubiquitin by the E2, forming a chain of ubiquitins; linking of the substrate protein to the ubiquitin chain by the ubiquitin ligase or E3; and passing of the protein with the polyubiquitin chain tag to the 26 proteasome, where it is degraded to low weight peptides. A reduction of degradation through proteasomes may cause intracellular accumulation of denaturalized proteins that may have a toxic effect on neurons or reduce its resistance to certain other toxic substances. Proteasome inhibition has been used to generate a mouse model of PD. The

existence of another responsible gene, the UCHL1, that codifies for a protein of the ubiquitin-26 proteasome pathway reinforces the importance of this pathway in the pathogenesis of PD.

The gene of PTEN-induced kinase 1 (PINK 1) codifies a serin/threonin kinase that is located in mitochondria that is induced by PTEN in response to oxidative stress. It is known very little about the protein function. It could play a protective role of neurons against the induced stress secondary to a mitochondrial dysfunction, linking genetic data with previous research that found mitochondrial dysfunction in patients with PD.

The DJ-1 protein is very abundant in brain, where is mainly expressed in astrocytes {Bandopadhyay, 2004 4900 /id}, located in mitochondria. Its acidic isoform is accumulated after the oxidative stress. This points out that DJ-1 has a role limiting cellular toxicity (Mitsumoto et al., 2001) DJ-1 has several functions. L166P DJ-1 is co-localized with mitochondria, in contrast to the diffuse cytoplasm and nuclear localization of the wild-type protein. As there is evidence of modifications in DJ-1 in response to oxidative stress, this suggests a role in oxidative stress function and mitochondria. In addition DJ-1 binds to PIAS, a SUMO-protein E3 ligase. SUMO is an ubiquitin-like protein that is involved in subcellular localization of proteins and increases proteins stability.

Finally LRRK2, it is a protein that is expressed in almost all brain regions (Zimprich A, 2004). It is a member of ROCO family (Bosgraaf and Van Haastert, 2003). Among its multiple functions there are substrate join, protein phosphorylation and protein-protein interactions (Paisan-Ruiz et al., 2004). Most pathogenic mutations are located in Roc and kinase domains. The domain LRRK2 kinase belongs to the MAPKKK subfamily of kinases. Its function, in physiological conditions, is still unknown. Leucine-rich regions of LRRK2 protein appear to play a role in activities that require protein-protein interactions, such as transmitting signals or helping to assemble the cell's cytoskeleton. It has been shown that LRRK2 interacts with PARKIN. The reduced penetrance and the variable pathology of cases with LRRK2 mutations indicate that dardarina, can increase the toxic effect of other mutations or external factors or alternatively decrease the survival capability of nigrostriatal neurons.

9.4.AIMS OF THE STUDY.

- 1.To characterize the familiar PD in which the so far known genes have been ruled out.
- 2.To describe the phenotypic characteristics.
- 3.To examine the pattern of inheritance using The Complex Segregation Analysis (CSA).
4. Mapping the genetic regions that are linked to Parkinson´s disease in these families through homozygosity search and exam of the Copy Number Variation (CNV) using a 500K SNPs array.

9.5.METHODS.

We have studied families with PD diagnosed by a neurologist who is expert in movement disorders, collected among patients from the area 4 (Ramon y Cajal Hospital, Madrid) and referral patients to a Neurogenetic clinic. After an informed consent about this genetic study and blood samples were taken.

We applied CSA of the obtained pedigrees (unified model of Lalouel, et al.) using the software “Pointer”.

We ruled out the known genes by sequencing, or an exam of the heterozygosity in case of recessive genes. In order to study the three most common genes (PARKIN, DJ-1 and PINK 1) involved in the recessive forms of inheritance of the disease, we selected two oligonucleotide primers flanking regions of each gene (PARKIN: D6S1035F, D6S980F; DJ-1: D1S548F, D1S1612; PINK 1: D1S1571F, D1S478F). After the sequence of DNA was amplified using the polymerase chain reaction (PCR), the PCR products were size-fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. In ease both fragments of each chromosome DNA strand would have different length this means they mark a different allele. That is what we know mapping by heterozygosity.

We investigated the common form of (LRRK2, although its pattern of inheritance is autosomal dominant due to the bizarre expression of this mutation.

In the informative families we mapped the region involved using a high-density DNA oligonucleotide array (Fodor et al., 1991;Pease et al., 1994) (500K SNPs Affymetrix array) implemented with the PLINK software. The results of PLINK analysis led us to a region of

interest. In this region we studied submicroscopic copy number variation of DNA segments ranging from kilobases (kb) to megabases (Mb) in size. This analysis is known CNAT and the variation in the number of copies (CNV) could refer to deletions, insertions, duplications and complex multi-site variants (Feuk et al., 2006;Freeman et al., 2006). In addition to multiplexed SNP genotyping, these arrays, in concert with the development of specialized algorithms, have been used to detect genome-wide DNA copy number changes that include loss of heterozygosity (LOH), deletions, and gene amplification events (Beroukhim et al., 2006;Bignell et al., 2007;Huang et al., 2006;Huang et al., 2004;Ishikawa et al., 2005;Komura et al., 2006;Laframboise et al., 2005;Nannya et al., 2005;Zhao et al., 2004). In addition we examined the appearance of CNV abnormalities in the autosomic recessive genes.

9.6.RESULTS.

The phenotypic characteristic are similar to the idiopathic late-onset PD with the same response to L-dopa therapies.

The functional neuroimaging study, iodine-123-betaIoflupane SPECT (Datscan®, GE) (Catafau and Tolosa, 2004), shows the degeneration of nigrostriatal pathway similar to the idiopathic forms with late-onset, with the typical anteroposterior gradient due to the selective loss of dopaminergic neurons located in the pars compacta of the *substantia nigra* that projects to the posterior putamen more than the caudate.

Our experiment concluded that there are several candidate genes (look figure 38).

CLUSTERS PATIENTS	BP1	BP2	KB	NSNP	CH R	GENE/ PROTEIN	FUNCIÓN
V-1and V-5, family 1 VI-3, family 2	128476625	129183196	706.571	110	6	PTPRK (Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa precursor)	Regulation of processes involving cell contact and adhesion such as growth control, tumor invasion, and metastasis. Forms complexes with beta-catenin and gamma-catenin/plakoglobin. Beta-catenin may be a substrate for the catalytic activity of PTP-kappa.
V-1 and V-5, family 1 VI-3, family2	33132456	34298641	1166.18	126	4	-	-
II-1 family 4a and II-3 family 4b	62181098	62804551	623.453	142	8	ASPH_HUMAN (Aspartate beta-hydroxylase)	Specifically hydroxylates an Asp or Asn residue in certain epidermal growth factor-like (EGF) domains of a number of proteins.

						RLBP1L1 (retinaldehyde binding protein 1-like 1)	Sec14p-like lipid-binding domain. Found in secretory proteins, such as <i>S. cerevisiae</i> phosphatidylinositol transfer protein (Sec14p), and in lipid regulated proteins such as RhoGAPs, RhoGEFs and neurofibromin (NF1); cd00170
II-1 family 4a and II-3 family 4b	51681895	52637092	955.197	161	8	SNTG1_HUMAN (Gamma-1-syntrophin)	Adapter protein that binds to and probably organizes the subcellular localization of a variety of proteins. May link various receptors to the actin cytoskeleton and the dystrophin glycoprotein complex (By similarity). May participate in regulating the subcellular location of diacylglycerol kinase-zeta to ensure that diacylglycerol is rapidly inactivated following receptor activation.
						PXDNL peroxidasin homolog (Drosophila)-like	Peroxidase activity Biological_process unknown
II-1 family 4a and II-3 family 4b	42737547	48116305	5378.76	148	8	ACHA6_HUMAN (Neuronal acetylcholine receptor subunit alpha-6 precursor)	After binding acetylcholine, the AChR responds by an extensive change in conformation that affects all subunits and leads to opening of an ion-conducting channel across the plasma membrane.
						THAP1_HUMAN (THAP domain-containing protein 1)	Pro-apoptotic protein that potentiates both serum-withdrawal and TNF-induced apoptosis.
						POTE8_HUMAN (Prostate, ovary, testis-expressed protein on chromosome 8)	-
						RN170_HUMAN (RING finger protein 170)	-
						HOOK3_HUMAN (Hook homolog 3)	Probable cytoskeletal linker protein, which is involved in tethering the Golgi complex to the cytoskeleton. Participates in defining the architecture and localization of the Golgi complex. Probably serves as a target for the spiC protein from <i>Salmonella typhimurium</i> , which inactivates it, leading to a strong alteration in cellular trafficking.

							PFTA_HUMAN (Protein farnesyltransferase/geranylgeranyltransferase type-1 subunit alpha)	Catalyzes the transfer of a farnesyl or geranyl-geranyl moiety from farnesyl or geranyl pyrophosphate to a cysteine at the fourth position from the C-terminus of several proteins having the C-terminal sequence Cys-aliphatic-aliphatic-X. The alpha subunit is thought to participate in a stable complex with the substrate. The beta subunit binds the peptide substrate.
							SG196_HUMAN Protein kinase-like protein SgK196	Membrane; Single-pass membrane protein (Potential).
							HGNAT_HUMAN (Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase)	Lysosomal acetyltransferase that acetylates the nonreducing terminal alpha-glucosamine residue of intralysosomal heparin or heparan sulfate, converting it into a substrate for luminal alpha-N-acetyl glucosaminidase.
II-1 family 4a and II-3 family 4b	103392153	104025139	632.986	151	7		ORC5_HUMAN (Origin recognition complex subunit 5)	Component of the origin recognition complex (ORC) that binds origins of replication. It has a role in both chromosomal replication and mating type transcriptional silencing. Binds to the ARS consensus sequence (ACS) of origins of replication in an ATP-dependent manner.
							LHPL3_HUMAN (Lipoma HMGIC fusion partner-like 3 protein)	Membrane; Multi-pass membrane protein (Potential).
							RELN_HUMAN (Reelin precursor)	Extracellular matrix serine protease that plays a role in layering of neurons in the cerebral cortex and cerebellum. Regulates microtubule function in neurons and neuronal migration. Affects migration of sympathetic preganglionic neurons in the spinal cord, where it seems to act as a barrier to neuronal migration. Enzymatic activity is important for the modulation of cell adhesion. Binding to the extracellular domains of lipoprotein receptors VLDLR and ApoER2 induces tyrosine phosphorylation of Dab1 and modulation of Tau phosphorylation (By similarity).

Figure 38: genes found and its function.

9.7. DISCUSSION.

The families described in this thesis disclose a new form of late-onset autosomic recessive Parkinson Disease. This fact is an against finding compared with other forms previously reported that are characterized by an early-onset (Bonifati et al., 2005; Klein et al., 2003). Very likely a similar pattern can be found in many seemingly sporadic PD patients.

The Complex Segregation Analysis allows us to know the suitable mathematical model of inheritance that is better adjusted in one family or in a group of families. There are different methods to do a CSA. We used the proposed by *Lalouel et al* in 1983 (Lalouel et al., 1983). We have not been able to conclude the presence of a Mendelian pattern of inheritance. It could be explain because the low number of families. Although in CSA it is not known the minimal number of samples to achieve an acceptable statistical power, we only have seven families, and we think that it is the main reason or our lack of a clear result. Other limitations are that CSA cannot distinguish the effect of only one locus that is under a trace than the effect of one or more independent loci with similar patterns of transmission (Gail Pairitz J., 1998).

The first step of the genetic analysis proposed in this thesis was ruled out the autosomal recessive forms described until now and other autonomic dominant forms very frequent from a statistical or geographical point of view. Homozigosity mapping could be criticized because there are heterozigotic forms of PD described recently, for example for PINK1 (Hedrich et al., 2006; Zadikoff et al., 2006a), or PARKIN gene (Sun et al., 2006) and other kind of genetic variation such as duplications (Chartier-Harlin et al., 2004; Farrer et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Ibanez et al., 2004; Nishioka et al., 2006b), or triplications (Miller et al., 2004; Singleton et al., 2004) of SNCA. This supposes an increment of the aggregability of the protein and indeed the genesis of the disease. Other limitation of the study is that we could not sequence all the genes (for example PARKIN). However, taking into account of this considerations, the second step of the study that supposed a whole genomic analysis using high density arrays (500K SNPs) (Gibbs and Singleton, 2006), is a guarantee in order to study deeply all the mentioned genes and other proposed.

High density arrays (500 K) are a new, easy and useful technique in the study of genetical complex diseases such as PD or Alzheimer Disease. The study of our samples has led to find out several regions of interest. Our pedigrees were carefully selectionated so have the suitable characteristic for this kind of studies. These are, first of all, the geographical area (isolated

populations), with a high rate of co-sanguinity and a founder effect. Another criteria is the relationship between the cases cannot be very close (siblings are not suitable for this sort of studies) because in these cases these individuals could share a wide region of the genome.

PLINK analysis is the method implemented to analyse the arrays. It has been developed recently. In a short period of time you can obtain a genome wide homozygosity mapping and the result in our cases is six clusters shared (two belongs to the three members of families 1 and 2, and four belongs to the two members of family 4).

CNAT analysis allows us to detect the number of copy variation. This technique allows us to rule out gene dose abnormalities increasing the confidence in our results.

To sum up, the high density arrays (500K) are changing the paradigm of the detection of chromosomal impairments and suppose a new target for the researchers that should consider this technique (analyse the copy number variation, the loss of heterozygosity and the genotype in the same experiment).

9.7.CONCLUSIONS.

1. The autosomal recessive, late onset, benign clinical forms of Familial Parkinson Disease exist in the general population.
2. These clinical forms appear as seemingly sporadic unless a detailed genealogic study discloses a recessive inheritance pattern.
3. Complex segregation analysis is not applicable to the study of these families with complex diseases like these herein reported because it does not take into account some facts such as pseudodominance patterns. Among other causative reasons we could include the own limitations of our CSA (the low number of individuals, n , necessary to confer statistical power). These are the reasons why we cannot ascertain the pattern of inheritance in our pedigrees by CSA.

4. High density arrays are an ease and quick tool to examine from a genetic-molecular point of view many families with neurological disease such as Parkinson Disease.
5. Homozygosity mapping with high density arrays allows to localize genes in families with recessive inheritance in which it is not possible to do a classical linkage analysis.
6. The Copy Number Variation Analysis (duplications, deletions, triplications) using high density arrays let us rule out the implication of the well-known recessive genes described (PINK1, DJ1 y PARKIN).
7. High-density SNPs arrays are the most powerful tool to evaluate familial forms of PD with complex genetics.

INDICE

8. INDICE.

1. Hipótesis.....	pag 11
2. Introducción.....	pag 13
3. Revisión Bibliográfica.....	pag 16
3.1. Epidemiología.....	pag 17
3.2. Características Clínicas y Patológicas.....	pag 18
3.3. Factores ambientales	pag 19
3.4. Genética de la EP.....	pag 20
3.4.1. Epidemiología genética.....	pag 20
3.4.2. Genética de enfermedades complejas.....	pag 21
3.4.3. Genética molecular de la EP familiar.....	pag 28
3.5. Patogenia de la EP a través de los genes conocidos.....	pag 38
Papel de la mitocondria.	
4. Objetivos del estudio.....	pag 41
5. Metodos.....	pag 43
5.1. Reclutamiento de las familias.....	pag 44
5.2. Selección de los pacientes y estudio fenotípico.....	pag 44
5.3. Consideraciones éticas del estudio.....	pag 45
5.4. Analisis de Segregacion Compleja.....	pag 45
“Pointer software”.	
5.5. Estudios genético moleculares.....	pag 47
5.5.1. Extracción de DNA.....	pag 47
5.5.2. Exclusión de genes recesivos ya descritos.....	pag 47
5.5.3. Exclusion de mutaciones en el gen.....	pag 49
a-sinucleina y de la mutacion comun lrrk2.	
5.5.4. Estudio de las familias con arrays de alta	pag
54 densidad de SNP (500 k).	
5.5.5. Mapeo de homocigosidad.....	pag 57
de las regiones genéticas ligadas a la EP	
mediante arrays de alta densidad de SNP	
(500K) con el programa PLINK.	
5.5.6. Estudio de la variabilidad en el número de.....	pag 58

copias genéticas con el programa CNAT
(Copy Number Analysis Tool)

6. Resultados.....	pag 62
6.1. Agregados familiares de EP.....	pag 63
6.2. Análisis de Segregación Compleja.....	pag 72
6.3. Genética molecular de los genes conocidos.....	pag 74
6.4. Mapeo de homocigosidad.....	pag 77
de las regiones genéticas ligadas a la EP mediante arrays de alta densidad de SNP	
6.5. Estudio de la variabilidad en el número de.....	pag 83
copias genéticas con el programa CNAT (Copy Number Analysis Tool)	
7. Discusión.....	pag 86
7.1. Estudios de agregados familiares.....	pag 87
7.2. Análisis de Segregación Compleja.....	pag 87
7.3. Genética Molecular de la EP.....	pag 88
7.4. Consideraciones metodológicas.....	pag 89
7.5. Biología de los genes localizados.....	pag 90
7.6. Perspectivas futuras.....	pag 92
8. Conclusiones.....	pag 94
9. English Summary.....	pag 96
10. Índice.....	pag 119
11. Bibliografía.....	pag 122
12. Apéndice.....	pag 139

BIBLIOGRAFIA

10. BIBLIOGRAFIA.

Abeliovich,A., Schmitz,Y., Farinas,I., Choi-Lundberg,D., Ho,W.H., Castillo,P.E., Shinsky,N., Verdugo,J.M., Armanini,M., Ryan,A., Hynes,M., Phillips,H., Sulzer,D., and Rosenthal,A. (2000). Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. 25, 239-252.

Abney,M., McPeck,M.S., and Ober,C. (2001). Broad and narrow heritabilities of quantitative traits in a founder population. *Am J Hum Genet*. 68, 1302-1307.

Akaike HA (1974). New look at the statistical model identification *IEEE. Transmission Automation Control* 19, 716-723.

Alvord,E.C., Jr., Forno,L.S., Kusske,J.A., Kauffman,R.J., Rhodes,J.S., and Goetowski,C.R. (1974). The pathology of Parkinsonism: a comparison of degenerations in cerebral cortex and brainstem. *Adv. Neurol*. 5:175-93., 175-193.

Baba,M., Nakajo,S., Tu,P.H., Tomita,T., Nakaya,K., Lee,V.M., Trojanowski,J.Q., and Iwatsubo,T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am. J. Pathol*. 152, 879-884.

Baldereschi,M., Di,C.A., Rocca,W.A., Vanni,P., Maggi,S., Perissinotto,E., Grigoletto,F., Amaducci,L., and Inzitari,D. (2000). Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology*. 55, 1358-1363.

Barbeau,A., and Pourcher,E. (1982). New data on the genetics of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci*. 9, 53-60.

Barbeau,A., Roy,M., and Boyer,L. (1984). Genetic studies in Parkinson's disease. *Adv. Neurol*. 40:333-9., 333-339.

Barbeau,A., Roy,M., and Cloutier,T. (1986). Smoking, cancer, and Parkinson's disease. *Ann. Neurol*. 20, 105-106.

Barinaga,M. (1995). New Alzheimer's gene found. *Science*. 268, 1845-1846.

Baumann,R.J., Jameson,H.D., McKean,H.E., Haack,D.G., and Weisberg,L.M. (1980). Cigarette smoking and Parkinson disease: 1. Comparison of cases with matched neighbors. *Neurology*. 30, 839-843.

Bennett,E.J., Bence,N.F., Jayakumar,R., and Kopito,R.R. (2005). Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol. Cell*. 17, 351-365.

Bernheimer,H., Birkmayer,W., Hornykiewicz,O., Jellinger,K., and Seitelberger,F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci*. 20, 415-455.

- Beroukhi, R., Lin, M., Park, Y., Hao, K., Zhao, X., Garraway, L.A., Fox, E.A., Hochberg, E.P., Mellinshoff, I.K., Hofer, M.D., Descazeaud, A., Rubin, M.A., Meyerson, M., Wong, W.H., Sellers, W.R., and Li, C. (2006). Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS. Comput. Biol.* 2, e41.
- Bertoli-Avella, A.M., Oostra, B.A., and Heutink, P. (2004). Chasing genes in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Hum Genet.* 114, 413-438.
- Bertram, L., and Tanzi, R.E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest.* 115, 1449-1457.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., Mackenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., and Greenamyre, J.T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 3, 1301-1306.
- Bharucha, N.E., Stokes, L., Schoenberg, B.S., Ward, C., Ince, S., Nutt, J.G., Eldridge, R., Calne, D.B., Mantel, N., and Duvoisin, R. (1986). A case-control study of twin pairs discordant for Parkinson's disease: a search for environmental risk factors. *Neurology.* 36, 284-288.
- Bignell, G.R., Santarius, T., Pole, J.C., Butler, A.P., Perry, J., Pleasance, E., Greenman, C., Menzies, A., Taylor, S., Edkins, S., Campbell, P., Quail, M., Plumb, B., Matthews, L., McLay, K., Edwards, P.A., Rogers, J., Wooster, R., Futreal, P.A., and Stratton, M.R. (2007). Architectures of somatic genomic rearrangement in human cancer amplicons at sequence-level resolution. *Genome Res.* 17, 1296-1303.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M.J., Schaap, O., Breedveld, G.J., Krieger, E., Dekker, M.C., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J.W., Vanacore, N., van Swieten, J.C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C.M., Oostra, B.A., and Heutink, P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science.* 299, 256-259.
- Bonifati, V., Rohe, C.F., Breedveld, G.J., Fabrizio, E., De, M.M., Tassorelli, C., Tavella, A., Marconi, R., Nicholl, D.J., Chien, H.F., Fincati, E., Abbruzzese, G., Marini, P., De, G.A., Horstink, M.W., Maat-Kievit, J.A., Sampaio, C., Antonini, A., Stocchi, F., Montagna, P., Toni, V., Guidi, M., Dalla, L.A., Tinazzi, M., De, P.F., Fabbrini, G., Goldwurm, S., de, K.A., Barbosa, E., Lopiano, L., Martignoni, E., Lamberti, P., Vanacore, N., Meco, G., and Oostra, B.A. (2005). Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes. *Neurology.* 65, 87-95.
- Bonney, G.E. (1986). Regressive logistic models for familial disease and other binary traits. *Biometrics.* 42, 611-625.
- Bosgraaf, L., and Van Haastert, P.J. (2003). Roc, a Ras/GTPase domain in complex proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1643, 5-10.
- Bridges, C.B. (1936). THE BAR "GENE" A DUPLICATION. *Science.* 83, 210-211.
- Buckland, P.R. (2003). Polymorphically duplicated genes: their relevance to phenotypic variation in humans. *Ann Med.* 35, 308-315.
- Canet-Aviles, R.M., Wilson, M.A., Miller, D.W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M.J., Ringe, D., Petsko, G.A., and Cookson, M.R. (2004). The Parkinson's disease protein

- DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* *101*, 9103-9108.
- Catafau, A.M., and Tolosa, E. (2004). Impact of dopamine transporter SPECT using 123I-Ioflupane on diagnosis and management of patients with clinically uncertain Parkinsonian syndromes. *Mov Disord.* *19*, 1175-1182.
- Caughey, B., and Lansbury, P.T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* *26*:267-98. *2003*, 267-298.
- Chartier-Harlin, M.C., 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., and Destee, A. (2004). Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet.* *364*, 1167-1169.
- Chartier-Harlin, M.C., Parfitt, M., Legrain, S., Perez-Tur, J., Brousseau, T., Evans, A., Berr, C., Vidal, O., Roques, P., Gourlet, V., and . (1994). Apolipoprotein E, epsilon 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of Alzheimer's disease: analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Hum Mol. Genet.* *3*, 569-574.
- Choi, W., Zibae, S., Jakes, R., Serpell, L.C., Davletov, B., Crowther, R.A., and Goedert, M. (2004). Mutation E46K increases phospholipid binding and assembly into filaments of human alpha-synuclein. *FEBS Lett.* *576*, 363-368.
- Clark, L.N., Afridi, S., Karlins, E., Wang, Y., Mejia-Santana, H., Harris, J., Louis, E.D., Cote, L.J., Andrews, H., Fahn, S., Waters, C., Ford, B., Frucht, S., Ottman, R., and Marder, K. (2006). Case-control study of the parkin gene in early-onset Parkinson disease. *Arch. Neurol.* *63*, 548-552.
- Conrad, B., and Antonarakis, S.E. (2007). Gene duplication: a drive for phenotypic diversity and cause of human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum Genet.* *8*:17-35., 17-35.
- Conrad, D.F., Andrews, T.D., Carter, N.P., Hurles, M.E., and Pritchard, J.K. (2006). A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat. Genet.* *38*, 75-81.
- Conway, K.A., Harper, J.D., and Lansbury, P.T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat. Med.* *4*, 1318-1320.
- Daniel, S.E., and Lees, A.J. (1993). Parkinson's Disease Society Brain Bank, London: overview and research. *J. Neural Transm. Suppl.* *39*:165-72., 165-172.
- Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science.* *302*, 819-822.
- de Rijk, M.C., Tzourio, C., Breteler, M.M., Dartigues, J.F., Amaducci, L., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J.M., Alperovitch, A., and Rocca, W.A. (1997). 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.* *62*, 10-15.

- Dekker, M.C., van Swieten, J.C., Houwing-Duistermaat, J.J., Snijders, P.J., Boeren, E., Hofman, A., Breteler, M.M., Heutink, P., Oostra, B.A., and van Duijn, C.M. (2003). A clinical-genetic study of Parkinson's disease in a genetically isolated community. *J Neurol.* *250*, 1056-1062.
- DeMichele G., Filla, A., Volpe, G., De, M., V, Gogliettino, A., Ambrosio, G., Marconi, R., Castellano, A.E., and Campanella, G. (1996). Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in southern Italy. *Mov Disord.* *11*, 17-23.
- Di, X., Matsuzaki, H., Webster, T.A., Hubbell, E., Liu, G., Dong, S., Bartell, D., Huang, J., Chiles, R., Yang, G., Shen, M.M., Kulp, D., Kennedy, G.C., Mei, R., Jones, K.W., and Cawley, S. (2005). Dynamic model based algorithms for screening and genotyping over 100 K SNPs on oligonucleotide microarrays. *Bioinformatics.* *21*, 1958-1963.
- Duffy P, and Tennyson.VM. (1965). Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus caeruleus in Parkinson's disease. *J Neuropathol. Exp Neurol.* *24*, 318-414, 318-314.
- Duvoisin, R.C. (1992). Overview of Parkinson's disease. *Ann N. Y. Acad Sci.* *648:187-93.*, 187-193.
- Duvoisin, R.C., Eldridge, R., Williams, A., Nutt, J., and Calne, D. (1981). Twin study of Parkinson disease. *Neurology.* *31*, 77-80.
- Elbaz, A., Bower, J.H., Maraganore, D.M., McDonnell, S.K., Peterson, B.J., Ahlskog, J.E., Schaid, D.J., and Rocca, W.A. (2002). Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J. Clin. Epidemiol.* *55*, 25-31.
- Falconer DS. (1965). The inheritance of liability to certain diseases, estimated from the incidence among relatives. *Ann Hum Genet Lond* *29*, *51*. 1965, 29.
- Fall, P.A., Axelson, O., Fredriksson, M., Hansson, G., Lindvall, B., Olsson, J.E., and Granerus, A.K. (1996). Age-standardized incidence and prevalence of Parkinson's disease in a Swedish community. *J. Clin. Epidemiol.* *49*, 637-641.
- Farrer, M., Chan, P., Chen, R., Tan, L., Lincoln, S., Hernandez, D., Forno, L., Gwinn-Hardy, K., Petrucelli, L., Hussey, J., Singleton, A., Tanner, C., Hardy, J., and Langston, J.W. (2001a). Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol.* *50*, 293-300.
- Farrer, M., Chan, P., Chen, R., Tan, L., Lincoln, S., Hernandez, D., Forno, L., Gwinn-Hardy, K., Petrucelli, L., Hussey, J., Singleton, A., Tanner, C., Hardy, J., and Langston, J.W. (2001b). Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann. Neurol.* *50*, 293-300.
- Farrer, M., Kachergus, J., Forno, L., Lincoln, S., Wang, D.S., Hulihan, M., Maraganore, D., Gwinn-Hardy, K., Wszolek, Z., Dickson, D., and Langston, J.W. (2004). Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol.* *55*, 174-179.
- Farrer, M., Stone, J., Mata, I.F., Lincoln, S., Kachergus, J., Hulihan, M., Strain, K.J., and Maraganore, D.M. (2005). LRRK2 mutations in Parkinson disease. *Neurology.* *65*, 738-740.
- Feuk, L., Carson, A.R., and Scherer, S.W. (2006). Structural variation in the human genome. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 85-97.

- Fodor,S.P., Read,J.L., Pirrung,M.C., Stryer,L., Lu,A.T., and Solas,D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*. 251, 767-773.
- Forno,L.S., and Norville,R.L. (1981). Synaptic morphology in the human locus ceruleus. *Acta Neuropathol*. 53, 7-14.
- Foroud,T. (2005). LRRK2: both a cause and a risk factor for Parkinson disease? *Neurology*. 65, 664-665.
- Freeman,J.L., Perry,G.H., Feuk,L., Redon,R., McCarroll,S.A., Altshuler,D.M., Aburatani,H., Jones,K.W., Tyler-Smith,C., Hurles,M.E., Carter,N.P., Scherer,S.W., and Lee,C. (2006). Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res*. 16, 949-961.
- Fuchs,J., Nilsson,C., Kachergus,J., Munz,M., Larsson,E.M., Schule,B., Langston,J.W., Middleton,F.A., Ross,O.A., Hulihan,M., Gasser,T., and Farrer,M.J. (2007). Phenotypic variation in a large Swedish pedigree due to SNCA duplication and triplication. *Neurology*. ..
- Funayama,M., Hasegawa,K., Kowa,H., Saito,M., Tsuji,S., and Obata,F. (2002). A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1. *Ann. Neurol*. 51, 296-301.
- Gail Pairitz J. (1998). Statistical genetics 98. Complex segregation analysis: Uses and limitations. *Am J Hum Genet* 63, 942-946. 1998..
- Gelb,D.J., Oliver,E., and Gilman,S. (1999). Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch. Neurol*. 56, 33-39.
- Gibb,W.R. (1992). Neuropathology of Parkinson's disease and related syndromes. *Neurol Clin*. 10, 361-376.
- Gibbs,J.R., and Singleton,A. (2006). Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond. *PLoS. Genet*. 2, e150.
- Godwin-Austen,R.B., Lee,P.N., Marmot,M.G., and Stern,G.M. (1982). Smoking and Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 45, 577-581.
- Goedert,M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci*. 2, 492-501.
- Golbe,L.I., Cody,R.A., and Duvoisin,R.C. (1986). Smoking and Parkinson's disease. Search for a dose-response relationship. *Arch. Neurol*. 43, 774-778.
- Golbe,L.I., Di,I.G., Sanges,G., Lazzarini,A.M., La,S.S., Bonavita,V., and Duvoisin,R.C. (1996). Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. *Ann Neurol*. 40, 767-775.
- Goldgaber,D., Lerman,M.I., McBride,O.W., Saffiotti,U., and Gajdusek,D.C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*. 235, 877-880.
- Gorell,J.M., Johnson,C.C., Rybicki,B.A., Peterson,E.L., Kortsha,G.X., Brown,G.G., and Richardson,R.J. (1999). Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 20, 239-247.

- Gosal,D., Ross,O.A., and Toft,M. (2006). Parkinson's disease: the genetics of a heterogeneous disorder. *Eur. J Neurol.* 13, 616-627.
- Gowers WT (1886). A manual of diseases of the nervous system. London, Churchill.
- Haack,D.G., Baumann,R.J., McKean,H.E., Jameson,H.D., and Turbek,J.A. (1981). Nicotine exposure and Parkinson disease. *Am. J. Epidemiol.* 114, 191-200.
- Haas,R.H., Nasirian,F., Nakano,K., Ward,D., Pay,M., Hill,R., and Shults,C.W. (1995). Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 37, 714-722.
- Hampshire,D.J., Roberts,E., Crow,Y., Bond,J., Mubaidin,A., Wriekat,A.L., Al-Din,A., and Woods,C.G. (2001). Kufor-Rakeb syndrome, pallido-pyramidal degeneration with supranuclear upgaze paresis and dementia, maps to 1p36. *J. Med. Genet.* 38, 680-682.
- Harhangi,B.S., Farrer,M.J., Lincoln,S., Bonifati,V., Meco,G., De,M.G., Brice,A., Durr,A., Martinez,M., Gasser,T., Bereznaï,B., Vaughan,J.R., Wood,N.W., Hardy,J., Oostra,B.A., and Breteler,M.M. (1999). The Ile93Met mutation in the ubiquitin carboxy-terminal-hydrolase-L1 gene is not observed in European cases with familial Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 270, 1-4.
- Hatano, Y., Sato,K., Elibol,B., Yoshino,H., Yamamura, Y., Bonifati,V., Shinotoh,H., Asahina,M., Kobayashi,S., Ng,A.R., Rosales,R.L., Hassin-Baer,S., Shinar,Y., Lu,C.S., Chang,H.C., Wu-Chou,Y.H., Atac,F.B., Kobayashi,T., Toda,T., Mizuno,Y., and Hattori,N. (2004). PARK6-linked autosomal recessive early-onset parkinsonism in Asian populations. *Neurology.* 63, 1482-1485.
- Healy,D.G., bou-Sleiman,P.M., Gibson,J.M., Ross,O.A., Jain,S., Gandhi,S., Gosal,D., Muqit,M.M., Wood,N.W., and Lynch,T. (2004). PINK1 (PARK6) associated Parkinson disease in Ireland. *Neurology.* 63, 1486-1488.
- Hedrich,K., Hagenah,J., Djarmati,A., Hiller,A., Lohnau,T., Lasek,K., Grunewald,A., Hilker,R., Steinlechner,S., Boston,H., Kock,N., Schneider-Gold,C., Kress,W., Siebner,H., Binkofski,F., Lencer,R., Munchau,A., and Klein,C. (2006). Clinical spectrum of homozygous and heterozygous PINK1 mutations in a large German family with Parkinson disease: role of a single hit? *Arch. Neurol.* 63, 833-838.
- Hicks,A.A., Petursson,H., Jonsson,T., Stefansson,H., Johannsdottir,H.S., Sainz,J., Frigge,M.L., Kong,A., Gulcher,J.R., Stefansson,K., and Sveinbjornsdottir,S. (2002). A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 52, 549-555.
- Hilker,R., Klein,C., Ghaemi,M., Kis,B., Strotmann,T., Ozelius,L.J., Lenz,O., Vieregge,P., Herholz,K., Heiss,W.D., and Pramstaller,P.P. (2001). Positron emission tomographic analysis of the nigrostriatal dopaminergic system in familial parkinsonism associated with mutations in the parkin gene. *Ann Neurol.* 49, 367-376.
- Hinds,D.A., Klok,A.P., Jen,M., Chen,X., and Frazer,K.A. (2006). Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. *Nat. Genet.* 38, 82-85.
- Horowitz,J.M., Pastor,D.M., Goyal,A., Kar,S., Ramdeen,N., Hallas,B.H., and Torres,G. (2003). BAX protein-immunoreactivity in midbrain neurons of Parkinson's disease patients. *Brain Res. Bull.* 62, 55-61.

- Hsu,M., Srinivas,B., Kumar,J., Subramanian,R., and Andersen,J. (2005). Glutathione depletion resulting in selective mitochondrial complex I inhibition in dopaminergic cells is via an NO-mediated pathway not involving peroxynitrite: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem.* 92, 1091-1103.
- Huang,Y., Cheung,L., Rowe,D., and Halliday,G. (2004). Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46, 44-70.
- Huang,Y., Hayes,M., Harding,A.J., Brooks,W.S., Fung,V.S., Rowe,D., Joffe,R., Crimmins,D., Hely,M., and Halliday,G.M. (2006). Anticipation of onset age in familial Parkinson's disease without SCA gene mutations. *Parkinsonism. Relat Disord.* 12, 309-313.
- Hubble,J.P., Cao,T., Hassanein,R.E., Neuberger,J.S., and Koller,W.C. (1993). Risk factors for Parkinson's disease. *Neurology.* 43, 1693-1697.
- Hughes,A.J., Daniel,S.E., Kilford,L., and Lees,A.J. (1992). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg. Psychiatry.* 55, 181-184.
- Ibanez,P., Bonnet,A.M., DeBarges,B., Lohmann,E., Tison,F., Pollak,P., Agid,Y., Durr,A., and Brice,A. (2004). Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease. *Lancet.* 364, 1169-1171.
- Inoue,K., and Lupski,J.R. (2002). Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu. Rev. Genomics Hum Genet.* 3:199-242. *Epub; %2002 Apr 15.*, 199-242.
- Iselius,L., Slack,J., Littler,M., and Morton,N.E. (1991). Genetic epidemiology of breast cancer in Britain. *Ann Hum Genet.* 55, 151-159.
- Ishikawa,A., Piao,Y.S., Miyashita,A., Kuwano,R., Onodera,O., Ohtake,H., Suzuki,M., Nishizawa,M., and Takahashi,H. (2005). A mutant PSEN1 causes dementia with Lewy bodies and variant Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 57, 429-434.
- Ishikawa,A., and Tsuji,S. (1996). Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type juvenile parkinsonism. *Neurology.* 47, 160-166.
- Jellinger,K. (1987). Neuropathological substrates of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *J Neural Transm. Suppl.* 24:109-29., 109-129.
- Kachergus,J., Mata,I.F., Hulihan,M., Taylor,J.P., Lincoln,S., Aasly,J., Gibson,J.M., Ross,O.A., Lynch,T., Wiley,J., Payami,H., Nutt,J., Maraganore,D.M., Czyzewski,K., Styczynska,M., Wszolek,Z.K., Farrer,M.J., and Toft,M. (2005). Identification of a novel LRRK2 mutation linked to autosomal dominant parkinsonism: evidence of a common founder across European populations. *Am J Hum Genet.* 76, 672-680.
- Kessler,I.I., and Diamond,E.L. (1971). Epidemiologic studies of Parkinson's disease. I. Smoking and Parkinson's disease: a survey and explanatory hypothesis. *Am. J. Epidemiol.* 94, 16-25.
- Khan,N.L., Valente,E.M., Bentivoglio,A.R., Wood,N.W., Albanese,A., Brooks,D.J., and Piccini,P. (2002). Clinical and subclinical dopaminergic dysfunction in PARK6-linked parkinsonism: an 18F-dopa PET study. *Ann Neurol.* 52, 849-853.

- Klein,C., Hedrich,K., Wellenbrock,C., Kann,M., Harris,J., Marder,K., Lang,A.E., Schwinger,E., Ozelius,L.J., Vieregge,P., Pramstaller,P.P., and Kramer,P.L. (2003). Frequency of parkin mutations in late-onset Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 54, 415-416.
- Klein,C., Schumacher,K., Jacobs,H., Hagenah,J., Kis,B., Garrels,J., Schwinger,E., Ozelius,L., Pramstaller,P., Vieregge,P., and Kramer,P.L. (2000). Association studies of Parkinson's disease and parkin polymorphisms. *Ann. Neurol.* 48, 126-127.
- Komura,D., Shen,F., Ishikawa,S., Fitch,K.R., Chen,W., Zhang,J., Liu,G., Ihara,S., Nakamura,H., Hurles,M.E., Lee,C., Scherer,S.W., Jones,K.W., Shapero,M.H., Huang,J., and Aburatani,H. (2006). Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays. *Genome Res.* 16, 1575-1584.
- Kondo,K. (1987). Epidemiological evaluations of risk factors in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 45:289-93., 289-293.
- Krige,D., Carroll,M.T., Cooper,J.M., Marsden,C.D., and Schapira,A.H. (1992). Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Ann. Neurol.* 32, 782-788.
- Kruger,R., Kuhn,W., Muller,T., Woitalla,D., Graeber,M., Kosel,S., Przuntek,H., Epplen,J.T., Schols,L., and Riess,O. (1998). Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* 18, 106-108.
- Kuopio,A.M., Marttila,R.J., Helenius,H., and Rinne,U.K. (1999). Changing epidemiology of Parkinson's disease in southwestern Finland. *Neurology.* 52, 302-308.
- Laframboise,T., Weir,B.A., Zhao,X., Beroukhim,R., Li,C., Harrington,D., Sellers,W.R., and Meyerson,M. (2005). Allele-specific amplification in cancer revealed by SNP array analysis. *PLoS. Comput. Biol.* 1, e65.
- Lalouel,J.M., Rao,D.C., Morton,N.E., and Elston,R.C. (1983). A unified model for complex segregation analysis. *Am J Hum Genet.* 35, 816-826.
- Lashuel,H.A., Petre,B.M., Wall,J., Simon,M., Nowak,R.J., Walz,T., and Lansbury,P.T., Jr. (2002). Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol. Biol.* 322, 1089-1102.
- Lazzarini,A.M., Myers,R.H., Zimmerman,T.R., Jr., Mark,M.H., Golbe,L.I., Sage,J.I., Johnson,W.G., and Duvoisin,R.C. (1994). A clinical genetic study of Parkinson's disease: evidence for dominant transmission. *Neurology.* 44, 499-506.
- Lee,C., Iafrate,A.J., and Brothman,A.R. (2007). Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat. Genet.* 39, S48-S54.
- Leroy,E., Boyer,R., and Polymeropoulos,M.H. (1998). Intron-exon structure of ubiquitin c-terminal hydrolase-L1. *DNA Res.* 5, 397-400.
- Lesage,S., Durr,A., Tazir,M., Lohmann,E., Leutenegger,A.L., Janin,S., Pollak,P., and Brice,A. (2006). LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *N. Engl. J Med.* 354, 422-423.

- Lesage,S., Ibanez,P., Lohmann,E., Pollak,P., Tison,F., Tazir,M., Leutenegger,A.L., Guimaraes,J., Bonnet,A.M., Agid,Y., Durr,A., and Brice,A. (2005a). G2019S LRRK2 mutation in French and North African families with Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 58, 784-787.
- Lesage,S., Leutenegger,A.L., Ibanez,P., Janin,S., Lohmann,E., Durr,A., and Brice,A. (2005b). 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.* 77, 330-332.
- Levy-Lahad,E., Wasco,W., Poorkaj,P., Romano,D.M., Oshima,J., Pettingell,W.H., Yu,C.E., Jondro,P.D., Schmidt,S.D., Wang,K., and . (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science.* 269, 973-977.
- Li,J., Uversky,V.N., and Fink,A.L. (2001). Effect of familial Parkinson's disease point mutations A30P and A53T on the structural properties, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. *Biochemistry.* 40, 11604-11613.
- Lincoln,S., Vaughan,J., Wood,N., Baker,M., Adamson,J., Gwinn-Hardy,K., Lynch,T., Hardy,J., and Farrer,M. (1999). Low frequency of pathogenic mutations in the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase gene in familial Parkinson's disease. *Neuroreport.* 10, 427-429.
- Locke,D.P., Sharp,A.J., McCarroll,S.A., McGrath,S.D., Newman,T.L., Cheng,Z., Schwartz,S., Albertson,D.G., Pinkel,D., Altshuler,D.M., and Eichler,E.E. (2006). Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am J Hum Genet.* 79, 275-290.
- Lowe,J., Blanchard,A., Morrell,K., Lennox,G., Reynolds,L., Billett,M., Landon,M., and Mayer,R.J. (1988). Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. *J Pathol.* 155, 9-15.
- Lucking,C.B., Abbas,N., Durr,A., Bonifati,V., Bonnet,A.M., de,B.T., De,M.G., Wood,N.W., Agid,Y., and Brice,A. (1998). Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. The European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease and the French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *Lancet.* 352, 1355-1356.
- Lupski,J.R., and Stankiewicz,P. (2005). Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS. Genet.* 1, e49.
- Maher,N.E., Golbe,L.I., Lazzarini,A.M., Mark,M.H., Currie,L.J., Wooten,G.F., Saint-Hilaire,M., Wilk,J.B., Volcjak,J., Maher,J.E., Feldman,R.G., Guttman,M., Lew,M., Waters,C.H., Schuman,S., Suhowersky,O., Lafontaine,A.L., Labelle,N., Vieregge,P., Pramstaller,P.P., Klein,C., Hubble,J., Reider,C., Growdon,J., Watts,R., Montgomery,E., Baker,K., Singer,C., Stacy,M., and Myers,R.H. (2002). Epidemiologic study of 203 sibling pairs with Parkinson's disease: the GenePD study. *Neurology.* 58, 79-84.
- Mann,V.M., Cooper,J.M., Daniel,S.E., Srai,K., Jenner,P., Marsden,C.D., and Schapira,A.H. (1994). Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Ann. Neurol.* 36, 876-881.

- Maraganore,D.M., Farrer,M.J., Hardy,J.A., Lincoln,S.J., McDonnell,S.K., and Rocca,W.A. (1999). Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease. *Neurology*. 53, 1858-1860.
- Martin,J.B. (1999). Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N. Engl. J Med.* 340, 1970-1980.
- Marttila,R.J., Kaprio,J., Koskenvuo,M., and Rinne,U.K. (1988). Parkinson's disease in a nationwide twin cohort. *Neurology*. 38, 1217-1219.
- Mata,I.F., Lockhart,P.J., and Farrer,M.J. (2004). Parkin genetics: one model for Parkinson's disease. *Hum. Mol. Genet.* 13 Spec No 1:R127-33. Epub;2004 Feb;19., R127-R133.
- 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., Schaffer,A.A., Yamamura,Y., Nakamura,S., Kuzuhara,S., Tsuji,S., and Mizuno,Y. (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 588-596.
- Mayeux,R. (1998). Gene-environment interaction in late-onset Alzheimer disease: the role of apolipoprotein-epsilon4. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 12 Suppl 3:S10-5., S10-S15.
- Mayeux,R., Marder,K., Cote,L.J., Denaro,J., Hemenegildo,N., Mejia,H., Tang,M.X., Lantigua,R., Wilder,D., Gurland,B., and . (1995). The frequency of idiopathic Parkinson's disease by age, ethnic group, and sex in northern Manhattan, 1988-1993. *Am. J. Epidemiol.* 142, 820-827.
- McCarroll,S.A., and Altshuler,D.M. (2007). Copy-number variation and association studies of human disease. *Nat. Genet.* 39, S37-S42.
- Miller,D.W., Hague,S.M., Clarimon,J., Baptista,M., Gwinn-Hardy,K., Cookson,M.R., and Singleton,A.B. (2004). Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology*. 62, 1835-1838.
- Mitsumoto,A., Nakagawa,Y., Takeuchi,A., Okawa,K., Iwamatsu,A., and Takanezawa,Y. (2001). Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat. *Free Radic. Res.* 35, 301-310.
- Mori,H. (2005). Pathological substrate of dementia in Parkinson's disease--its relation to DLB and DLBD. *Parkinsonism. Relat Disord.* 11 Suppl 1:S41-5., S41-S45.
- Nagakubo,D., Taira,T., Kitaura,H., Ikeda,M., Tamai,K., Iguchi-Ariga,S.M., and Ariga,H. (1997). DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 509-513.
- Nannya,Y., Sanada,M., Nakazaki,K., Hosoya,N., Wang,L., Hangaishi,A., Kurokawa,M., Chiba,S., Bailey,D.K., Kennedy,G.C., and Ogawa,S. (2005). A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res.* 65, 6071-6079.
- Nefzger,M.D., Quadfasel,F.A., and Karl,V.C. (1968). A retrospective study of smoking in Parkinson's disease. *Am J Epidemiol.* 88, 149-158.

- Nguyen,D.Q., Webber,C., and Ponting,C.P. (2006). Bias of selection on human copy-number variants. *PLoS. Genet.* 2, e20.
- Nicklas,W.J., Vyas,I., and Heikkila,R.E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36, 2503-2508.
- 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., and Hattori,N. (2006b). Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 59, 298-309.
- 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., and Hattori,N. (2006a). Clinical heterogeneity of alpha-synuclein gene duplication in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 59, 298-309.
- Paisan-Ruiz,C., Jain,S., Evans,E.W., Gilks,W.P., Simon,J., van der,B.M., Lopez de,M.A., Aparicio,S., Gil,A.M., Khan,N., Johnson,J., Martinez,J.R., Nicholl,D., Carrera,I.M., Pena,A.S., de,S.R., Lees,A., Marti-Masso,J.F., Perez-Tur,J., Wood,N.W., and Singleton,A.B. (2004). Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron.* 44, 595-600.
- Paisan-Ruiz,C., Saenz,A., Lopez de,M.A., Marti,I., Martinez,G.A., Marti-Masso,J.F., and Perez-Tur,J. (2005). Familial Parkinson's disease: clinical and genetic analysis of four Basque families. *Ann Neurol.* 57, 365-372.
- Pankratz,N., Nichols,W.C., Uniacke,S.K., Halter,C., Rudolph,A., Shults,C., Conneally,P.M., and Foroud,T. (2003). Significant linkage of Parkinson disease to chromosome 2q36-37. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1053-1057.
- Parker,W.D., Jr., Boyson,S.J., and Parks,J.K. (1989). Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 26, 719-723.
- Payami,H., Zarepari,S., James,D., and Nutt,J. (2002). Familial aggregation of Parkinson disease: a comparative study of early-onset and late-onset disease. *Arch. Neurol.* 59, 848-850.
- Pease,A.C., Solas,D., Sullivan,E.J., Cronin,M.T., Holmes,C.P., and Fodor,S.P. (1994). Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 91, 5022-5026.
- Piccini,P., Burn,D.J., Ceravolo,R., Maraganore,D., and Brooks,D.J. (1999). The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. *Ann. Neurol.* 45, 577-582.
- Polymeropoulos,M.H., Higgins,J.J., Golbe,L.I., Johnson,W.G., Ide,S.E., Di,I.G., Sanges,G., Stenroos,E.S., Pho,L.T., Schaffer,A.A., Lazzarini,A.M., Nussbaum,R.L., and Duvoisin,R.C. (1996). Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science.* 274, 1197-1199.
- Polymeropoulos,M.H., Lavedan,C., Leroy,E., Ide,S.E., Dehejia,A., Dutra,A., Pike,B., Root,H., Rubenstein,J., Boyer,R., Stenroos,E.S., Chandrasekharappa,S., Athanassiadou,A.,

- Papapetropoulos,T., Johnson,W.G., Lazzarini,A.M., Duvoisin,R.C., Di,I.G., Golbe,L.I., and Nussbaum,R.L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 276, 2045-2047.
- Preux,P.M., Condet,A., Anglade,C., Druet-Cabanac,M., Debrock,C., Macharia,W., Couratier,P., Boutros-Toni,F., and Dumas,M. (2000). Parkinson's disease and environmental factors. Matched case-control study in the Limousin region, France. *Neuroepidemiology*. 19, 333-337.
- Rajput,A.H., Offord,K.P., Beard,C.M., and Kurland,L.T. (1987). A case-control study of smoking habits, dementia, and other illnesses in idiopathic Parkinson's disease. *Neurology*. 37, 226-232.
- Rajput,A.H., Rozdilsky,B., and Rajput,A. (1991). Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism--a prospective study. *Can. J. Neurol. Sci.* 18, 275-278.
- Redon,R., Ishikawa,S., Fitch,K.R., Feuk,L., Perry,G.H., Andrews,T.D., Fiegler,H., Shapero,M.H., Carson,A.R., Chen,W., Cho,E.K., Dallaire,S., Freeman,J.L., Gonzalez,J.R., Gratacos,M., Huang,J., Kalaitzopoulos,D., Komura,D., MacDonald,J.R., Marshall,C.R., Mei,R., Montgomery,L., Nishimura,K., Okamura,K., Shen,F., Somerville,M.J., Tchinda,J., Valsesia,A., Woodwark,C., Yang,F., Zhang,J., Zerjal,T., Zhang,J., Armengol,L., Conrad,D.F., Estivill,X., Tyler-Smith,C., Carter,N.P., Aburatani,H., Lee,C., Jones,K.W., Scherer,S.W., and Hurles,M.E. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 444, 444-454.
- Repping,S., van Daalen,S.K., Brown,L.G., Korver,C.M., Lange,J., Marszalek,J.D., Pyntikova,T., van,d., V, Skaletsky,H., Page,D.C., and Rozen,S. (2006). High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes. *Nat. Genet.* 38, 463-467.
- Risch,N. (2001). The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10, 733-741.
- Risch,N. (1990). Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. *Am J Hum Genet.* 46, 222-228.
- Rogaeva,E., Johnson,J., Lang,A.E., Gulick,C., Gwinn-Hardy,K., Kawarai,T., Sato,C., Morgan,A., Werner,J., Nussbaum,R., Petit,A., Okun,M.S., McInerney,A., Mandel,R., Groen,J.L., Fernandez,H.H., Postuma,R., Foote,K.D., Salehi-Rad,S., Liang,Y., Reimsnider,S., Tandon,A., Hardy,J., St George-Hyslop,P., and Singleton,A.B. (2004). Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 61, 1898-1904.
- Rovelet-Lecrux,A., Hannequin,D., Raux,G., Le,M.N., Laquerriere,A., Vital,A., Dumanchin,C., Feuillette,S., Brice,A., Vercelletto,M., Dubas,F., Frebourg,T., and Campion,D. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat. Genet.* 38, 24-26.
- Roy,M., Boyer,L., and Barbeau,A. (1983). A prospective study of 50 cases of familial Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* 10, 37-42.
- Ruiz,A. (1997). Complex segregation analysis of schizophrenia in Santiago, Chile. *Schizophr. Res.* 26, 65-69.
- Rybicki,B.A., and Elston,R.C. (2000). The relationship between the sibling recurrence-risk ratio and genotype relative risk. *Am J Hum Genet.* 66, 593-604.

- Schaid,D.J., and Sommer,S.S. (1993). Genotype relative risks: methods for design and analysis of candidate-gene association studies. *Am J Hum Genet.* 53, 1114-1126.
- Schapira,A.H., Cooper,J.M., Dexter,D., Clark,J.B., Jenner,P., and Marsden,C.D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54, 823-827.
- Schapira,A.H., Cooper,J.M., Dexter,D., Jenner,P., Clark,J.B., and Marsden,C.D. (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet.* 1, 1269.
- Scott,W.K., Zhang,F., Stajich,J.M., Scott,B.L., Stacy,M.A., and Vance,J.M. (2005). Family-based case-control study of cigarette smoking and Parkinson disease. *Neurology.* 64, 442-447.
- Sebat,J., Lakshmi,B., Troge,J., Alexander,J., Young,J., Lundin,P., Maner,S., Massa,H., Walker,M., Chi,M., Navin,N., Lucito,R., Healy,J., Hicks,J., Ye,K., Reiner,A., Gilliam,T.C., Trask,B., Patterson,N., Zetterberg,A., and Wigler,M. (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science.* 305, 525-528.
- Semchuk,K.M., and Love,E.J. (1995). Effects of agricultural work and other proxy-derived case-control data on Parkinson's disease risk estimates. *Am. J. Epidemiol.* 141, 747-754.
- Semchuk,K.M., Love,E.J., and Lee,R.G. (1993). Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology.* 43, 1173-1180.
- Sharp,A.J., Locke,D.P., McGrath,S.D., Cheng,Z., Bailey,J.A., Vallente,R.U., Pertz,L.M., Clark,R.A., Schwartz,S., Segraves,R., Oseroff,V.V., Albertson,D.G., Pinkel,D., and Eichler,E.E. (2005). Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet.* 77, 78-88.
- Shaw-Smith,C., Redon,R., Rickman,L., Rio,M., Willatt,L., Fiegler,H., Firth,H., Sanlaville,D., Winter,R., Colleaux,L., Bobrow,M., and Carter,N.P. (2004). Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med. Genet.* 41, 241-248.
- Shimura,H., Hattori,N., Kubo,S., Mizuno,Y., Asakawa,S., Minoshima,S., Shimizu,N., Iwai,K., Chiba,T., Tanaka,K., and Suzuki,T. (2000). Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat. Genet.* 25, 302-305.
- Singleton,A., Gwinn-Hardy,K., Sharabi,Y., Li,S.T., Holmes,C., Dendi,R., Hardy,J., Singleton,A., Crawley,A., and Goldstein,D.S. (2004). Association between cardiac denervation and parkinsonism caused by alpha-synuclein gene triplication. *Brain.* 127, 768-772.
- Singleton,A.B., Farrer,M., Johnson,J., Singleton,A., Hague,S., Kachergus,J., Hulihan,M., Peuralinna,T., Dutra,A., Nussbaum,R., Lincoln,S., Crawley,A., Hanson,M., Maraganore,D., Adler,C., Cookson,M.R., Muenter,M., Baptista,M., Miller,D., Blancato,J., Hardy,J., and Gwinn-Hardy,K. (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science.* 302, 841.
- Solano,S.M., Miller,D.W., Augood,S.J., Young,A.B., and Penney,J.B., Jr. (2000). Expression of alpha-synuclein, parkin, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 mRNA in human brain: genes associated with familial Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 47, 201-210.

- Speicher, M.R., and Carter, N.P. (2005). The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat. Rev. Genet.* 6, 782-792.
- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Jakes, R., Hasegawa, M., and Goedert, M. (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 95, 6469-6473.
- Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., and Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 388, 839-840.
- Strauss, K.M., Martins, L.M., Plun-Favreau, H., Marx, F.P., Kautzmann, S., Berg, D., Gasser, T., Wszolek, Z., Muller, T., Bornemann, A., Wolburg, H., Downward, J., Riess, O., Schulz, J.B., and Kruger, R. (2005). Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Mol. Genet.* 14, 2099-2111.
- Sun, M., Latourelle, J.C., Wooten, G.F., Lew, M.F., Klein, C., Shill, H.A., Golbe, L.I., Mark, M.H., Racette, B.A., Perlmuter, J.S., Parsian, A., Guttman, M., Nicholson, G., Xu, G., Wilk, J.B., Saint-Hilaire, M.H., DeStefano, A.L., Prakash, R., Williamson, S., Suchowersky, O., Labelle, N., Growdon, J.H., Singer, C., Watts, R.L., Goldwurm, S., Pezzoli, G., Baker, K.B., Pramstaller, P.P., Burn, D.J., Chinnery, P.F., Sherman, S., Vieregge, P., Litvan, I., Gillis, T., MacDonald, M.E., Myers, R.H., and Gusella, J.F. (2006). Influence of heterozygosity for parkin mutation on onset age in familial Parkinson disease: the GenePD study. *Arch. Neurol.* 63, 826-832.
- Takahashi, H., Ohama, E., Suzuki, S., Horikawa, Y., Ishikawa, A., Morita, T., Tsuji, S., and Ikuta, F. (1994). Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathologic study in a family. *Neurology.* 44, 437-441.
- Tanner, C.M. (1989). The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 12, 49-54.
- Tanner, C.M., Goldman, S.M., Aston, D.A., Ottman, R., Ellenberg, J., Mayeux, R., and Langston, J.W. (2002). Smoking and Parkinson's disease in twins. *Neurology.* 58, 581-588.
- Tanner, C.M., Ottman, R., Goldman, S.M., Ellenberg, J., Chan, P., Mayeux, R., and Langston, J.W. (1999). Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA.* 281, 341-346.
- Taylor, C.A., Saint-Hilaire, M.H., Cupples, L.A., Thomas, C.A., Burchard, A.E., Feldman, R.G., and Myers, R.H. (1999). Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study. *Am. J. Med. Genet.* 88, 742-749.
- Tuzun, E., Sharp, A.J., Bailey, J.A., Kaul, R., Morrison, V.A., Pertz, L.M., Haugen, E., Hayden, H., Albertson, D., Pinkel, D., Olson, M.V., and Eichler, E.E. (2005). Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat. Genet.* 37, 727-732.
- Twelves, D., Perkins, K.S., and Counsell, C. (2003). Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 18, 19-31.
- Tzourio, C., Rocca, W.A., Breteler, M.M., Baldereschi, M., Dartigues, J.F., Lopez-Pousa, S., Manubens-Bertran, J.M., and Alperovitch, A. (1997). Smoking and Parkinson's disease. An age-dependent risk effect? The EUROPARKINSON Study Group. *Neurology.* 49, 1267-1272.

- Uitti,R.J., Shinotoh,H., Hayward,M., Schulzer,M., Mak,E., and Calne,D.B. (1997). "Familial Parkinson's disease"--a case-control study of families. *Can. J. Neurol. Sci.* 24, 127-132.
- Urban,A.E., Korbel,J.O., Selzer,R., Richmond,T., Hacker,A., Popescu,G.V., Cubells,J.F., Green,R., Emanuel,B.S., Gerstein,M.B., Weissman,S.M., and Snyder,M. (2006). High-resolution mapping of DNA copy alterations in human chromosome 22 using high-density tiling oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 103, 4534-4539.
- Valente,E.M., bou-Sleiman,P.M., Caputo,V., Muqit,M.M., Harvey,K., Gispert,S., Ali,Z., Del,T.D., Bentivoglio,A.R., Healy,D.G., Albanese,A., Nussbaum,R., Gonzalez-Maldonado,R., Deller,T., Salvi,S., Cortelli,P., Gilks,W.P., Latchman,D.S., Harvey,R.J., Dallapiccola,B., Auburger,G., and Wood,N.W. (2004b). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 304, 1158-1160.
- Valente,E.M., bou-Sleiman,P.M., Caputo,V., Muqit,M.M., Harvey,K., Gispert,S., Ali,Z., Del,T.D., Bentivoglio,A.R., Healy,D.G., Albanese,A., Nussbaum,R., Gonzalez-Maldonado,R., Deller,T., Salvi,S., Cortelli,P., Gilks,W.P., Latchman,D.S., Harvey,R.J., Dallapiccola,B., Auburger,G., and Wood,N.W. (2004a). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* 304, 1158-1160.
- van de Warrenburg,B.P., Lammens,M., Lucking,C.B., Deneffe,P., Wesseling,P., Booij,J., Praamstra,P., Quinn,N., Brice,A., and Horstink,M.W. (2001). Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology.* 56, 555-557.
- Vierегge,P. (1994). Genetic factors in the etiology of idiopathic Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Park Dis. Dement. Sect.* 8, 1-37.
- Vierегge,P., Hagenah,J., Heberlein,I., Klein,C., and Ludin,H.P. (1999). Parkinson's disease in twins: a follow-up study. *Neurology.* 53, 566-572.
- Vierегge,P., Schiffke,K.A., Friedrich,H.J., Muller,B., and Ludin,H.P. (1992). Parkinson's disease in twins. *Neurology.* 42, 1453-1461.
- Wakabayashi,K., Matsumoto,K., Takayama,K., Yoshimoto,M., and Takahashi,H. (1997). NACP, a presynaptic protein, immunoreactivity in Lewy bodies in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 239, 45-48.
- Ward,C.D., Duvoisin,R.C., Ince,S.E., Nutt,J.D., Eldridge,R., and Calne,D.B. (1983). Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of quadruplets. *Neurology.* 33, 815-824.
- Wetmur,J.G., Schwartz,J., and Elizan,T.S. (1979). Nucleic acid homology studies of viral nucleic acids in idiopathic Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 36, 462-464.
- Wilkinson,K.D., Deshpande,S., and Larsen,C.N. (1992). Comparisons of neuronal (PGP 9.5) and non-neuronal ubiquitin C-terminal hydrolases. *Biochem. Soc. Trans.* 20, 631-637.
- Wilkinson,K.D., Lee,K.M., Deshpande,S., Duerksen-Hughes,P., Boss,J.M., and Pohl,J. (1989). The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science.* 246, 670-673.
- Wittke-Thompson,J.K., Pluzhnikov,A., and Cox,N.J. (2005). Rational inferences about departures from Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet.* 76, 967-986.

- Zadikoff,C., Rogaeva,E., Djarmati,A., Sato,C., Salehi-Rad,S., St George-Hyslop,P., Klein,C., and Lang,A.E. (2006b). Homozygous and heterozygous PINK1 mutations: considerations for diagnosis and care of Parkinson's disease patients. *Mov Disord.* 21, 875-879.
- Zadikoff,C., Rogaeva,E., Djarmati,A., Sato,C., Salehi-Rad,S., St George-Hyslop,P., Klein,C., and Lang,A.E. (2006a). Homozygous and heterozygous PINK1 mutations: considerations for diagnosis and care of Parkinson's disease patients. *Mov Disord.* 21, 875-879.
- Zarranz,J.J., Alegre,J., Gomez-Esteban,J.C., Lezcano,E., Ros,R., Ampuero,I., Vidal,L., Hoenicka,J., Rodriguez,O., Atares,B., Llorens,V., Gomez,T.E., Del,S.T., Munoz,D.G., and de Yebenes,J.G. (2004). The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 55, 164-173.
- Zhang,Z.X., Anderson,D.W., Huang,J.B., Li,H., Hong,X., Wei,J., Yang,E.L., and Maraganore,D.M. (2003). Prevalence of Parkinson's disease and related disorders in the elderly population of greater Beijing, China. *Mov Disord.* 18, 764-772.
- Zhang,Z.X., and Roman,G.C. (1993). Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. *Neuroepidemiology.* 12, 195-208.
- Zhao,X.P., Zheng,H.M., Xie,H.J., Ding,S.J., and Ren,D.M. (2004). [The alpha-synuclein gene microsatellite polymorphism and late-onset sporadic Parkinson's disease susceptibility]. *Zhonghua Yi. Xue. Yi. Chuan Xue. Za Zhi.* 21, 339-341.
- Zimprich,A., Biskup,S., Leitner,P., Lichtner,P., Farrer,M., Lincoln,S., Kachergus,J., Hulihan,M., Uitti,R.J., Calne,D.B., Stoessl,A.J., Pfeiffer,R.F., Patenge,N., Carbajal,I.C., Vieregge,P., Asmus,F., Muller-Myhsok,B., Dickson,D.W., Meitinger,T., Strom,T.M., Wszolek,Z.K., and Gasser,T. (2004a). Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron.* 44, 601-607.
- Zimprich,A., Muller-Myhsok,B., Farrer,M., Leitner,P., Sharma,M., Hulihan,M., Lockhart,P., Strongosky,A., Kachergus,J., Calne,D.B., Stoessl,J., Uitti,R.J., Pfeiffer,R.F., Trenkwalder,C., Homann,N., Ott,E., Wenzel,K., Asmus,F., Hardy,J., Wszolek,Z., and Gasser,T. (2004b). The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 11-19.

APENDICE

11.APENDICE.

Publicaciones:

1. Manzano S, Barón M, Gómez-Tortosa E, Barquero MS, Jiménez-Escrig A. Inheritance of Alzheimer's Disease investigated by Complex Segregation Analysis. Aceptado.
2. Sagrario M. Palomo and Adriano Jiménez-Escrig. Translating genetics findings into therapy in Parkinson Disease. *Recent patents on CNS drug discovery*, 2007; 2: 229-237.
3. Comunicación-Póster: S. Manzano, M.E. Rioja, A. Jimenez-Escrig. Clinical and functional description of a new form of autosomic recessive familial Parkinson's disease with late onset. 8th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases: Progress and new perspectives (Salzburgo, Austria, 2007).

Consentimiento informado para estudios genéticos.

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mediante el presente documento, expreso mi conformidad para participar en el proyecto de investigación titulado:

ESTUDIO DE FORMAS FAMILIARES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON AUTOSOMAL RECESIVA EN POBLACIONES AISLADAS

D/Dña.....,

DNI.....

Quiero manifestar que deseo participar de forma voluntaria en este estudio, del que he sido informado que:

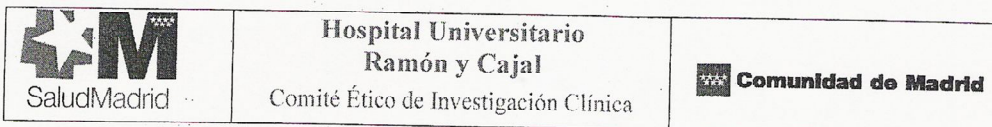
1. He sido informado por el Médico.....Col N°.....
2. Conozco que:
 - 2.1. Se trata de un estudio de investigación sobre enfermedad de Parkinson hereditaria.
 - 2.2. La participación en el estudio es voluntaria y en cualquier momento puedo retirarme del estudio.
 - 2.3. El estudio conlleva la realización de cuestionario sobre la capacidad cognitiva del paciente y la extracción de una muestra sanguínea que se utilizará para examinar diversos polimorfismos genéticos y proteínas plasmáticas relacionados con las demencias degenerativas.
 - 2.4. Los resultados del estudio son confidenciales y las muestras solo se utilizarán para este estudio salvo autorización expresa del paciente.
 - 2.5. He sido informado de los principales riesgos, inconvenientes y consecuencias del estudio
 - 2.6. Los datos se tratarán de acuerdo con lo establecido en la Ley Orgánica de protección de datos 15/1999, teniendo el paciente acceso y derecho a la rectificación y cancelación de sus datos. Los datos serán publicados en una revista científica, evitándose la identificación directa de los pacientes.

Lo que firmo en Madrid, adede 200..

Firma del Investigador:

Firma del paciente o de su representante legal en caso de incapacidad:

Aprobación del proyecto por parte del Comité Etico del Hospital Ramón y Cajal de Madrid.



Dra. M^a. ANGELES GALVEZ MÚGICA, Secretaria del Comité Etico de Investigación Clínica del Hospital Ramón y Cajal

CERTIFICA

Que el Comité Etico de Investigación Clínica, ha evaluado el **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:**

Título:


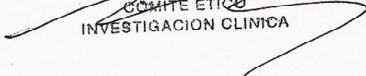
ESTUDIO DE FORMAS FAMILIARES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON AUTOSOMAL RECESIVA EN POBLACIONES AISLADAS.

Investigador/a Principal: **Dr. ADRIANO JIMENEZ ESCRIG**

Servicio: **NEUROLOGIA**

Y ha decidido su **APROBACIÓN.**



Lo que firmo en Madrid a 27 de Abril de 2007



COMITÉ ETICO
INVESTIGACION CLINICA

Fdo.: Dra. M^a. Ángeles Gálvez Múgica
Secretaria del CEIC.

Web de mutaciones de Parkinson:

<http://www.telefonica.net/web2/neuro-mancha> centro/Parkinson-Related-Mutations/

español

Parkinson Disease Related Mutations

Web page contents updated by Dra. Sagrario Manzano Palomo from the Department of Neurology of the "Complejo Hospitalario La Mancha Centro" hospital in Alózar de San Juan, Ciudad Real (Spain) and Dr. Adriano Jiménez Esorig from the Department of Neurology of the "Hospital Universitario Ramón y Cajal" in Madrid. Spain.

GENE	INHERITANCE	LOCUS	PROTEIN	MUTATIONS	REFERENCE
SNCA	AD	PARK1/4 (4q21)	Alfa-Synuclein SNCA	A30P	Krugger et al 1998
				G46L	Zarranz et al 2004
				A53T	Polymeropoulos et al 1997
				Duplications	Chartier-Harlin 2004 Farrer et al 2004 Fuchs et al 2007 Ibanez et al 2004 Nishioka et al 2006
				Triplications	Miller et al 2004 Singleton et al 2003
PARKIN	AR	PARK2 (8q26-27)	Parkin	Ex2-3dup	Periquet M et al. 2003
				Ex2-4dup	Periquet M et al. 2003 Foroud Tet al. 2003

Criterios Diagnósticos del Banco de Cerebros de la Sociedad de la Enfermedad de Parkinson del Reino Unido (UK PDSBB):

Paso 1: Diagnóstico de Parkinsonismo

Bradicinesia y al menos uno de los siguientes:

- Rigidez muscular.
- Temblor en reposo de 4–6 Hz.
- Inestabilidad postural no causada por disfunción visual primaria, vestibular, cerebelar o propioceptiva.

Paso 2: Características que tienden a excluir la enfermedad de Parkinson como causa de Parkinsonismo:

- Historia de apoplejías repetidas con progresión lenta de características parkinsonianas.
- Historia de injurias repetidas de la cabeza.
- Historia de encefalitis definida.
- Tratamiento con neurolépticos al comienzo de los síntomas.
- >1 afectación relativa.
- Remisión sostenida.
- Características estrictamente unilateral después de 3 años
- Parálisis supranuclear de la mirada.
- Signos cerebelares.
- Compromiso autosómico severo temprano.
- Demencia severa temprana con disturbios de la memoria, lenguaje y praxis
- Signo de Babinski.
- Presencia de un tumor cerebral o hidrocefalia comunicante en la tomografía computada (TC).
- Respuesta negativa a grandes dosis de levodopa (si la malabsorción es excluida).
- Exposición a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

Paso 3: Características que soportan un diagnóstico de enfermedad de Parkinson (tres o más son requeridos para el diagnóstico definitivo de enfermedad de Parkinson):

- Comienzo unilateral.
- Temblor de reposo presente.
- Enfermedad progresiva.

- Asimetría persistente afectando el lado del comienzo.

- Excelente respuesta (70–100%) a la levodopa.
- Corea severa inducida por levodopa.
- Respuesta a la levodopa por ≥ 5 años.
- Curso clínico de ≥ 10 años.

Criterios para el Diagnóstico de Enfermedad de Parkinson (Gelb y col., 1999):

Agrupación de características clínicas de la enfermedad de Parkinson de acuerdo a la utilidad diagnóstica.

Grupo A: Aspectos característicos de la enfermedad de Parkinson

- Temblor en reposo.
- Brdicinesia.
- Rigidez.
- Comienzo asimétrico.

Grupo B: Aspectos sugestivos de diagnósticos alternativos

- Características inusuales tempranas en el curso clínico.
- Inestabilidad postural prominente en los primeros 3 años posteriores al comienzo de los síntomas.
- Fenómeno de congelamiento (freezing) en los primeros 3 años.
- Alucinaciones no relacionadas a medicamentos en los primeros 3 años.
- Demencia precediendo a los síntomas motores o en el primer año.
- Parálisis supranuclear de la mirada (otro que la restricción de la mirada ascendente) o enlentecimiento de los movimientos verticales de los ojos.
- Síntomas severos de disautonomía no relacionadas a medicamentos.
- Documentación de una condición conocida que produce Parkinsonismo y posibilidad de conectarlos con los síntomas del paciente (como consecuencia de lesiones cerebrales focales localizadas o uso de neurolépticos en los pasados 6 meses).

Criterios para diagnóstico POSIBLE de enfermedad de Parkinson:

Al menos 2 de las 4 características del Grupo A presentes; al menos 1 de estos es temblor o bradicinesia.

Y uno de estos:

- Ninguna de las características del grupo B presentes.

-Los síntomas han estado presentes por al menos 3 años y ninguna de las características del grupo B están presentes al día.

Y uno de estos:

- Respuesta sustancial y sostenida a la levodopa o a un agonista de la dopamina ha sido documentada,
- O el paciente no ha tenido una adecuada prueba con levodopa o agonista de la dopamina.

Criterios para el diagnóstico PROBABLE de Enfermedad de Parkinson:

Al menos 3 o las 4 características del Grupo A presentes

Y

Ninguna de las características del Grupo B están presentes (nota: duración de los síntomas de al menos 3 años es necesario para reunir este requisito)

Y

Respuesta sustancial y sostenida a la levodopa o a un agonista de la dopamina ha sido documentada

Criterios para el diagnóstico DEFINITIVO de enfermedad de Parkinson:

Todos los criterios para Enfermedad de Parkinson POSIBLE están presentes

Y

Confirmación histopatológica del diagnóstico es obtenida en la autopsia

Criterios propuestos para la confirmación histopatológica de la Enfermedad de Parkinson:

- Depleción sustancial de células nerviosas con gliosis acompañando en la sustancia nigra.
- Al menos 1 cuerpo de Lewy en la sustancia nigra o en el locus ceruleus (nota: para esto puede ser necesario examinar más de 4 secciones no superpuestas en cada de esas áreas antes de concluir que los cuerpos de Lewy están ausentes).
- No evidencia patológica de otras enfermedades que producen Parkinsonismo (por ej. parálisis supranuclear progresiva, atrofia sistémica múltiple, degeneración gangliónica cortico–basal) (Nota: en la exclusión de otras enfermedades que producen Parkinsonismo, los criterios publicados del consenso deberían ser utilizados cuando estén disponibles)

Estadios de evolución de la Enfermedad de Parkinson:

Estadiaoje de Hoehn y Yahr:

Estadio 1

Signos y síntomas en un solo lado
Síntomas leves
Síntomas molestos pero no incapacitantes
Presencia de síntomas con temblor en alguna extremidad
Amigos notan cambios en la postura, expresión facial y marcha

Estadio 2

Síntomas bilaterales
Mínima discapacidad
La marcha y la postura están afectadas

Estadio 3

Significante enlentecimiento de los movimientos corporales
Dificultad para mantener el equilibrio tanto de pie como al andar.
Disfunción generalizada moderadamente severa

Estadio 4

Síntomas severos
Todavía puede andar cierto recorrido
Rigidez y bradicinesia
No puede vivir solo
El temblor puede ser menor que en los estadios anteriores

Estadio 5

Estadio caquético
Invalidez total
No puede andar ni mantenerse de pie
Requiere cuidados de una enfermera

Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS):

1. Estado mental, Conducta, Humor

Afectación Intelectual

- 0-ninguna
- 1-leve (olvido con recuerdo parcial de algunos hechos sin otras dificultades)
- 2-moderada pérdida de memoria con desorientación y moderada dificultad manejando problemas complejos
- 3-severa pérdida de memoria con desorientación temporal y a menudo espacial, severa dificultad con los problemas
- 4-severa pérdida de memoria con orientación sólo para personas, incapaz de juzgar o resolver problemas

Trastorno del pensamiento

- 0-ninguno
- 1-sueño intenso
- 2-alucinaciones "benignas" con retención de las mismas
- 3-alucinaciones mas frecuentes sin retención, pueden interferir con la actividad diaria
- 4-alucinaciones persistentes, ilusiones, o psicosis floridas.

Depresión

- 0-no presente
- 1-periodos de tristeza o culpabilidad superiores a lo normal, nunca presentes durante más de unos días o una semana
- 2-depresión persistente durante más de 1 semana
- 3-síntomas vegetativos (insomnio, anorexia, abulia, pérdida de peso)
- 4-síntomas vegetativos con tendencias suicidas

Motivación/Iniciativa

- 0-normal
- 1-menos afirmativo, más pasivo
- 2-pérdida de iniciativa o desinterés en actitudes electivas
- 3-pérdida de iniciativa o desinterés en la rutina diaria
- 4-abandono, pérdida completa de motivación

2. Actividades de la Vida Diaria

Lenguaje

- 0-normal
- 1-levemente afectado, sin dificultad para ser entendido
- 2-moderadamente afectado, puede ser preguntado para repetir las cosas
- 3-severamente afectado, se le pide frecuentemente que repita las cosas
- 4-ininteligible la mayor parte del tiempo

Salivación

- 0-normal
- 1-leve
- 2-moderada excesiva salivación, babeo nocturno
- 3-marcado babeo

Deglución

- 0-normal
- 1-obstrucción rara

- 2-obstrucción ocasional
- 3-requiere comida blanda
- 4-requiere intubación

Escritura

- 0-normal
- 1-levemente pequeña o lenta
- 2-todas las palabras pequeñas pero legibles
- 3-severamente afectada, no son legibles todas las palabras
- 4-mayoritariamente ilegibles

Cortar alimentos/Manejar Utensilios

- 0-normal
- 1-lento y poco hábil pero se vale solo
- 2-puede cortar la mayoría de alimentos, para algunos necesita ayuda
- 3-le deben cortar la comida, pero puede alimentarse solo
- 4-necesita que lo alimenten

Vestir

- 0-normal
- 1-lento, pero sin ayuda
- 2-ocasionalmente necesita ayuda
- 3-necesita considerable ayuda aunque puede hacer algunas cosas solo
- 4-necesita ayuda completa

Higiene

- 0-normal
- 1-lento pero sin ayuda
- 2-necesita ayuda con la ducha o el baño o es muy lento en el cuidado de la higiene
- 3-necesita ayuda para lavarse, cepillarse los dientes, ir al baño
- 4-necesita ayuda completa

Volverse en la Cama/ Ajustar las sábanas

- 0-normal
- 1-lento pero sin ayuda
- 2-puede volverse o ajustar las sábanas pero con gran dificultad
- 3-no puede volverse o ajustarse las sábanas solo
- 4-necesita ayuda completa

Caídas-Sin relación al Freezing

- 0-ninguna
- 1-raras
- 2-ocasionales, menos de una por día
- 3-una por día de media
- 4-más de 1 por día

Freezing al caminar

- 0-normal
- 1-raro, puede haber duda
- 2-caídas ocasionales por freezing
- 3-frecuente freezing, caídas ocasionales
- 4-frecuentes caídas por freezing

Andar

- 0-normal
- 1-leve dificultad, arrastra las piernas o disminuye el balanceo de los brazos

- 2-moderada dificultad sin requerir ayuda
- 3-severa afectación que requiere asistencia
- 4-no puede andar incluso con ayuda

Temblor

- 0-ausente
- 1-leve e infrecuente, no molesta al paciente
- 2-moderado, molesto para el paciente
- 3-severo, interfiere con muchas actividades
- 4-marcado, interfiere con muchas actividades

Molestias sensoriales relacionadas con el Parkinsonismo

- 0-ninguna
- 1-ocasionalmente tiene insensibilidad, hormigueo, y leve dolor
- 2-frecuente pero no estresante
- 3-sensación de dolor frecuente
- 4-dolor insoportable

3. Examen Motor

Lenguaje

- 0-normal
- 1-leve pérdida de expresión, dicción, volumen
- 2-monotono, mal articulado pero comprensible
- 3-marcada dificultad, difícil de entender
- 4-ininteligible

Expresión Facial

- 0-Normal
- 1-leve hipomimia
- 2-leve pero definida disminución anormal de la expresión
- 3-mod. hipomimia, labios separados parte del tiempo
- 4-cara fija, labios separados 1/2 cm o más con pérdida completa de expresión

Temblor de Reposo

Cara

- 0-ausente
- 1-leve e infrecuente
- 2-leve y presente la mayor parte del tiempo
- 3-moderado y presente la mayor parte del tiempo
- 4-marcado y presente la mayor parte del tiempo

Extremidad Superior Derecha

- 0-ausente
- 1-leve e infrecuente
- 2-leve y frecuente la mayor parte del tiempo
- 3-moderado y frecuente la mayor parte del tiempo
- 4-marcado y frecuente la mayor parte del tiempo

Extremidad Superior Izquierda

- 0-ausente
- 1-leve e infrecuente
- 2-leve y frecuente la mayor parte del tiempo
- 3-moderado y frecuente la mayor parte del tiempo
- 4-marcado y frecuente la mayor parte del tiempo

Extremidad Inferior Derecha

- 0-ausente
- 1-leve e infrecuente
- 2-leve y frecuente la mayor parte del tiempo
- 3-moderado y frecuente la mayor parte del tiempo
- 4-marcado y frecuente la mayor parte del tiempo

Extremidad Inferior Izquierda

- 0-ausente
- 1-leve e infrecuente
- 2-leve y frecuente la mayor parte del tiempo
- 3-moderado y frecuente la mayor parte del tiempo
- 4-marcado y frecuente la mayor parte del tiempo

Temblor Postural o de Acción

Extremidad Superior Derecha

- 0-ausente
- 1-leve, presente con acción
- 2-moderado, presente con acción
- 3-moderado, presente con acción y manteniendo la postura
- 4-marcado, interfiere con la alimentación

Extremidad Superior Izquierda

- 0-ausente
- 1-leve, presente con acción
- 2-moderado, presente con acción
- 3-moderado, presente con acción y manteniendo la postura
- 4-marcado, interfiere con la alimentación

Rigidez

Cuello

- 0-ausente
- 1-leve o sólo con actividad
- 2-leve/moderada
- 3-marcada, en todo el rango de movimiento
- 4-severa

Extremidad Superior Derecha

- 0-ausente
- 1-leve o sólo con actividad
- 2-leve/moderada
- 3-marcada, en todo el rango de movimiento
- 4-severa

Extremidad Superior Izquierda

- 0-ausente
- 1-leve o sólo con actividad
- 2-leve/moderada
- 3-marcada, en todo el rango de movimiento
- 4-severa

Extremidad Inferior Derecha

- 0-ausente
- 1-leve o sólo con actividad
- 2-leve/moderada
- 3-marcada, en todo el rango de movimiento
- 4-severa

Extremidad Inferior Izquierda

- 0-ausente
- 1-leve o sólo con actividad
- 2-leve/moderada
- 3-marcada, en todo el rango de movimiento
- 4-severa

Tocarse la Punta de los Dedos

Derechos

- 0-normal
- 1-leve lentitud, y/o reducción en amplitud
- 2-moderada dificultad.
- 3-severa dificultad.
- 4-puede apenas realizarlos

Izquierdos

- 0-normal
- 1-leve lentitud, y/o reducción en amplitud
- 2-moderada dificultad.
- 3-severa dificultad.
- 4-puede apenas realizarlos

Movimientos de la mano (abrir y cerrar las manos en rápida sucesión)

Derecha

- 0-normal
- 1-leve lentitud, y/o reducción en amplitud
- 2-moderada dificultad.
- 3-severa dificultad.
- 4- apenas puede realizarlos

Izquierda

- 0-normal
- 1-leve lentitud, y/o reducción en amplitud
- 2-moderada dificultad.
- 3-severa dificultad.
- 4- apenas puede realizarlos

Movimientos Alternativos Rápidos (pronación y supinación de las manos)

Derecha

- 0-normal
- 1-leve lentitud, y/o reducción en amplitud
- 2-moderada dificultad.
- 3-severa dificultad.
- 4- apenas puede realizarlos

Izquierda

- 0-normal
- 1-leve lentitud, y/o reducción en amplitud
- 2-moderada dificultad.
- 3-severa dificultad.
- 4- apenas puede realizarlos

Agilidad en la pierna (movimientos con el talón sobre el suelo, amplitud debería ser de 8

cm)

Derecha

- 0-normal
- 1-leve lentitud, y/o reducción en amplitud
- 2-moderada dificultad.
- 3-severa dificultad.
- 4- apenas puede realizarlos

Izquierda

- 0-normal
- 1-leve lentitud, y/o reducción en amplitud
- 2-moderada dificultad.
- 3-severa dificultad.
- 4- apenas puede realizarlos

Levantarse de una silla (con brazos cruzados)

- 0-normal
- 1-lento, puede necesitar más de un intento
- 2-se empuja hacia arriba con los brazos o la silla
- 3-tiende a caer hacia atrás, puede necesitar muchos intentos pero puede levantarse sin ayuda
- 4-incapaz de levantarse sin ayuda

Postura

- 0-normal erecto
- 1-levemente inclinado, podría ser normal para una persona mayor
- 2-anormal. Inclinado, puede que hacia algún lado
- 3-severa inclinación con escoliosis
- 4-marcada flexión con postura muy anormal

Marcha

- 0-normal
- 1- anda lentamente
- 2- anda con dificultad, con poca o sin ayuda, algún balanceo, pasos cortos o propulsión
- 3-afectación severa, necesita ayuda frecuente
- 4-no puede andar

Estabilidad Postural (test de retropulsión)

- 0-normal
- 1-se recupera sin ayuda
- 2-caería si no se coge
- 3-se cae espontaneamente
- 4-imposible mantenerse de pie

Bradicinesia/ Hipocinesia

- 0-nada
- 1-minima lentitud, podría ser normal
- 2-leve lentitud y excasez de movimientos, definitivamente anormales, o disminuye la amplitud de movimientos
- 3-moderada lentitud, excasez de movimientos, o disminuye la amplitud de movimientos
- 4-marcada lentitud, excasez de movimientos, o disminuye la amplitud de movimientos

Plink: Whole genome association analysis toolset:

-Manejo de datos:

- Creación de archivos PED file
- Modificar archivos PED file
- Unir archivos PED file
- Extracción de datos (SNPs o individuos)
- Comprimir los datos del PED file en formato binario.

-Resumen estadístico para control de calidad:

- Alelos, frecuencias de genotipos, HWE tests
- Tasas de genotipos “Missing”
- Inbreeding, estadística de IBS e IBD para individuos y pares de individuos
- Transmisión no Mendeliana en estudios familiares
- Chequeo del sexo basado en SNPs del cromosoma X
- Tests de errores en genotipado

-Detección de estratificación de poblaciones:

- Agrupamiento jerárquico
- Test significativo para determinar si dos individuos pertenecen a la misma población
- Mostrar clusters por fenotipo, tamaño y/o criterios externos

-Tests de asociación básicos:

- Caso/control
 - Test alélicos *standard*.
 - Tests Mantel-Haenszel y Breslow-Day para muestras estratificadas
 - Modelos dominante/recesivo y general

- Tests de comparación de modelos (e.j. general versus multiplicativo)
- Asociación basada en familias (TDT)
- Rasgos cuantitativos, de asociación e interacción
- Asociación condicional en uno o más SNPs
- Valores de p asintóticos y empíricos

-Tests adicionales:

- Tests de asociación basados en genes
 - Test de Hotelling's T(2)
- Screening de epistasis (SNP-por-SNP a gen-por-gen)
- Interacciones de genes con el ambiente con factores ambientales continuos y dicotómicos

