



FACULTAD DE ENFERMERÍA
Y TERAPIA OCUPACIONAL

Grado en Enfermería

Trabajo Fin de Grado

**Detección de polimorfismos en genes
asociados a enfermedad de Parkinson
en una población de enfermos de
Extremadura**

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA
MOLECULAR Y GENÉTICA

**Autor: Elisabet Uribe Carretero.
Tutor: José Manuel Fuentes Rodríguez**

Cáceres, Mayo de 2014

Abreviaturas:

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AJ: del inglés *Ashkenazi Jews*, Judíos Asquenazíes.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

EP: Enfermedad de Parkinson

FW: del inglés *forward*, se refiere al primer que se une a la cadena homónima.

GBA: del inglés *Glucosidase Beta Acid*, glucocerebrosidasa, Se denomina así tanto al gen codificante como a la proteína codificada.

LAAAD: L-aminoácido-aromático-descarboxilasa

LRRK2: del inglés *Leucine-rich repeat kinase 2*

MAO-B: Monoaminoxidasa B

MPP+: del inglés *metyl-fenyl-piryrdine*

MPTP: del inglés *metyl-fenyl-tetrahydropyridine*, metilfeniltetrahidropiridina

Pb: pares de bases.

PCR: del inglés *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.

PINK1: del inglés *Phosphatase and tensin homolog (PTEN)-induced kinase 1*.

PQ: Paraquat

qPCR: del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction* reaccione en cadena de la polimerasa cuantitativa.

RLFP: del inglés *Restriction fragment length polymorphism*

RV: del inglés **reverse**, se refiere al primer que se une a la cadena homónima.

SNCA: alfa sinucleína.

SNpc: *Substntia Nigra pars compacta*, parte compacta de la sutancia negra.

SNPs: del inglés *simple nucleotid polimorfism*, Polimorfismos de Nucleótido Simple

SV: del inglés *synonymus variant*, variante sinónima.

Tm: temperatura melting

Lista de figuras

Figura 1. “*Essay of shalking palsy*” por James Parkinson

Figura 2: Estructura química de MPTP, MPP+ y PQ p3

Figura 3: Plegamiento de la molécula de ADN p7

Figura 4: Estructura básica del ADN y sus componentes. A: estructura simplificada de un nucleótido. B: Bases nitrogenadas

Figura 5: Simulación de las etapas de la PCR

Figura 6: Amplificación de fragmentos de ADN por PCR

Figura 7: Acción de una enzima de restricción, **1**: unión al sustrato **2**: corte de la molécula

Figura 8: Punto de corte de XhoI

Figura 9: Punto de corte de NciI

Figura 10: Purificación del producto de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7, 8 y 9 para SNCA exón 1.

Figura 11: Producto de PCR de los pacientes 1, 5, 6, 7, 8 de SNCA exón 2

Figura 12: Producto de PCR de los pacientes 5 y 6 de PARK2 exón 2.

Figura 13: Producto de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6 y 7 para PARK2 exón 4.

Figura 14: Producto de PCR de los pacientes 1, 3, 6, 8, y un control (C) para PARK2 exón 5

Figura 15: Producto de PCR de los pacientes 3, 5, 6, 7, y 8 para PARK2 exón 6.

Figura 16: Producto de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7 y control para PARK2 exones 7 y 8

Figura 17: Análisis de alineamiento, zona intrónica 7-8, exón 8 marcado en amarillo, gen *PARK2*. MEGA 5.0.

Figura 18: Producto PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7, 8 y control para PINK1 exón 2

Figura 19: Purificación del producto de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7, 8 y 9 para PINK1 exón 3.

Figura 20: Purificación del producto de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7, 8, y 9 para PINK1 exón 4.

Figura 21: Producto de PCR purificado de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7 y 8 para PINK1 exón 5.

Figura 22: Producto purificado de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7 y 8 para PINK1 exón 6

Figura 23: Producto purificado de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7, y 8 para PINK1 exón 7

Figura 24: Análisis alineamiento, zona intrónica 7-8, exón 5, gen PINK1.

Figura 25: Producto de PCR de los pacientes 1,3, 5, 6, 7, 8, 9, y control para LRRK2 exón 31

Figura 26: Producto de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, y control para LRRK2 exón 41

Figura 27: Productos de PCR L444P y N370S

Figura 28: Electroforesis del producto de RFLP por duplicado para N370S de todos los pacientes 1-9.

Figura 29: Electroforesis del producto de la restricción para L444P de los pacientes 1-9 y de una muestra control.

Figura 30: RFPL de una muestra con mutación en GBA N370S (1, 4, 7) frente a una muestra control (2, 3, 5, 6)

Figura 31: Resultados de qPCR de los pacientes 1 al 9. La región de puntos de color azul oscuro representa la muestra del paciente 3 (genotipo TT), En la zona central aparecen marcados en color verde los resultados de los pacientes 1, 7, 8, 9, (genotipo AT). Por último los resultados de los pacientes 6 y 7 aparecen en color rojo (genotipo AA). Los cuadrados de color negro son controles negativos sin ADN.

Lista de tablas

Tabla 1: Genes implicados en la EP

Tabla 2: Selección de primers para los transcritos objeto de estudio A: longitud de la secuencia exónica B: longitud total del producto de PCR.

Tabla3: Tm óptima de PCR para cada exón analizado

Tabla4: Reacción para qPCR

Tabla 5: Reacción de PCR para la amplificación del fragmento de GBA necesario para la restricción con XhoI (N370S) y NciI (L444P)

Tabla 6: Restricción enzimática para N370S

Tabla7: Restricción enzimática para L444P

Tabla 8: Primers para PCR y enzimas de restricción

Tabla9: Preparación de muestras y geles para electroforesis

Tabla 10: Exones y protocolos utilizados para el estudio

Tabla 11: Variaciones detectadas en uno de los casos

Índice

1. Introducción:	
1.1. Enfermedad de Parkinson.....	1
1.2. La Importancia del diagnóstico genético.....	6
1.3. Genética de la EP	11
1.3.1. Park1/Park4: Alfa-sinucleína.....	13
1.3.2. Park2: Parkina.....	14
1.3.3. Park6: Pink1.....	15
1.3.4. Park8: LRRK2.....	15
1.3.5. Park 16: GBA.....	16
1.3.6. Hemooxigenasa-1.....	17
2. Objetivos.....	19
3. Material y métodos.....	21
3.1. Material:.....	21
3.1.1. Equipos.....	21
3.1.2. Reactivos.....	22
3.2. Métodos.....	2
6	
3.2.1. Métodos bioinformáticos.....	26
1. Selección de los genes objeto de estudio.....	26
2. Diseño de cebadores (primers).....	26
3. Selección de genes y transcritos.....	28
4. Análisis de los resultados de secuenciación.....	34
3.2.2. Métodos de Biología Molecular.....	35
1. Obtención De muestras.....	35
2. Purificación de ADN, Kit “ArchivePure DNA purification Manual”.....	35
3. Cuantificación de la muestra purificada.....	36
4. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	37
5. Reacción en Cadena de la polimerasa en tiempo real, o PCR cuantitativa (qPCR, RT-PCR).....	40
6. Restriction fragment length polymorphism (RFLP).....	41

7. Electroforesis en gel de agarosa.....	42
4. Resultados.....	45
1. Resultados de los experimentos de secuenciación.....	45
2. Resultados de RFPL.....	50
3. Resultados de qPCR.....	51
5. Discusión.....	53
6. Bibliografía.....	55

1

Introducción.

1.1 La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson fue descrita, de manera detallada, por primera vez en 1817 por el médico británico James Parkinson. En su ensayo sobre la que bautizó como “*Shaking Palsy*” (**Figura1**), realiza un análisis pormenorizado de 6 casos, describiendo la clínica de la EP como “*movimientos temblorosos involuntarios, con disminución de la potencia muscular en la movilidad pasiva y activa, con propensión a encorvar el tronco hacia adelante y a pasar de caminar a correr; los sentidos y el intelecto no sufren mayor daño*”. La descripción del trastorno era bastante completa, sin embargo no mencionaba dos síntomas fundamentales: la rigidez y los trastornos cognoscitivos.

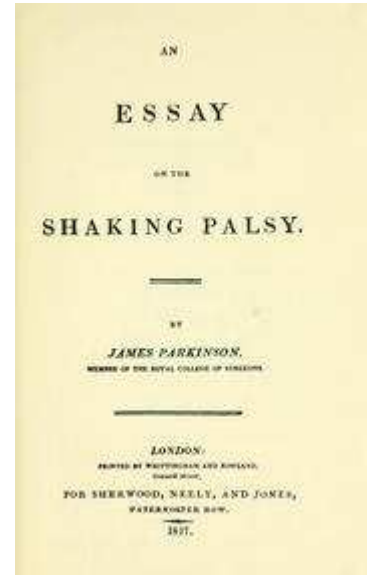


Figura1. “*Essay of shaking palsy*” por James Parkinson

Más tarde, en 1861, Charcot y Vulpain publicaron la obra “De la paralysie agitante” en la que mencionan la alteración de las facultades psíquicas en los enfermos. Charcot, fue quien años más tarde denominó el síndrome como Enfermedad de Parkinson (EP) (*Lecons sur les maladies du système nerveux*, 1875).

La EP es un síndrome neurodegenerativo que afecta a las neuronas de la sustancia nigra pars compacta (SNpc) que son productoras de dopamina. La destrucción de estas neuronas hace que se la producción de dopamina sea insuficiente para el funcionamiento correcto de la ruta nigroestriada. Ésta conecta la sustancia negra con el cuerpo estriado, ruta fundamental en el control del sistema musculoesquelético.

Pese a la especial alteración de esta vía, no es la única afectada por la falta de dopamina, también influye en la ruta mesolímbica (Conecta con el sistema límbico, modificando el estado de ánimo), mesocortical (Inerva la corteza cerebral, afectando a los procesos cognitivos), y mesopalidal (deteriorando procesos). (Lang and Lozano 1998)

Sintomatología:

El conjunto de síntomas que se presentan en la EP están íntimamente relacionados con alteraciones en el control motor. La progresión de la EP suele ser de forma lenta y gradual.

- Temblor: Movimiento rítmico hacia atrás y hacia delante. Suele comenzar en la mano o pie que se va extendiendo a todos los miembros. Puede agudizarse en reposo o en situaciones de estrés y desaparece por lo general durante el sueño. Puede ser unilateral o bilateral. Aparece también temblor en reposo.
- Rigidez: Se presenta en forma de resistencia, o falta de flexibilidad muscular. Este síntoma se agrava conforme avanza la enfermedad.
- Bradicinesia: También llamada lentitud de movimientos. Este es uno de los síntomas más incapacitantes puesto que pierde la facultad de realizar movimientos que con anterioridad eran prácticamente mecánicos.
- Inestabilidad postural. La combinación de los síntomas anteriores hacen que este tipo de pacientes se caigan con facilidad, adaptan una postura típica, con caída hacia delante de la cabeza y los hombros, lo que dificulta aún más la deambulación. Estos pacientes suelen caminar con pasos cortos y rápidos para mantener el equilibrio.
- Hipoquinesia: es la disminución de movimientos voluntarios. Se manifiesta como un enlentecimiento en la iniciación y realización de éstos.

Tratamiento:

Levodopa (L-DOPA): El objetivo es estimular las vías dopaminérgicas de la ruta nigroestriada. L-dopa es un precursor de la dopamina que traspasa la barrera hematoencefálica. Este fármaco se administra de forma conjunta con Carbidopa, que inhibe la L-aminoácido-aromático-descarboxilasa (LAAD), enzima encargada de transformar la L-DOPA en dopamina. Carbidopa no atraviesa la barrera hematoencefálica, lo que disminuyen los efectos adversos del tratamiento frenando la sobreestimulación dopaminérgica fuera del sistema nervioso central que es la diana farmacológica.

Inhibidores de la monoaminoxidasa-B (MAO-B): Los más utilizados son Selegilina y Rasagilina. Su uso provoca un aumento de los niveles de dopamina en el ganglio basal, ya inhibiendo su metabolismo. Su uso retrasa el avance de la enfermedad. Mejora los síntomas motores.

Hay también técnicas novedosas en cuanto a tratamiento quirúrgico. La estimulación cerebral profunda es un tratamiento de vanguardia en ámbito de la neurociencia. Esto consiste en un electrodo que se inserta en el cerebro. Una vez alojado genera una serie de pulsos eléctricos que interfieren y bloquean las señales eléctricas que causan los síntomas de Parkinson, disminuyéndolos de manera significativa.

Aún no se ha logrado hallar un tratamiento que detenga el avance de la enfermedad.

Causas:

La etiología completa de la EP está aún por esclarecer pero se sabe que es de carácter multifactorial. Es decir, surge de la confluencia de factores genéticos y ambientales.

Factores ambientales:

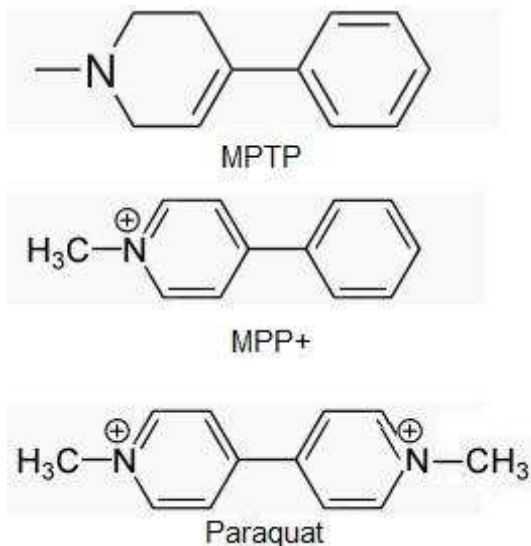


Figura 2 estructura química de MPTP, MPP+ y PQ

La exposición a diversos pesticidas y sustancias químicas aumentan el riesgo de padecer EP (**Figura 2**).

La primera de ellas es la neurotoxina metil-fenil-tetrahidropiridina (MPTP) (**Figura 2**). La relación entre la exposición a MPTP y el desarrollo de la EP se estableció a raíz de que, una serie de jóvenes adictos a la meperidina (derivado sintético de la heroína) desarrollasen parkinsonismo sensible al tratamiento con L-DOPA. Tiempo más tarde se averiguó que habían consumido contenía un 3% de MPTP. Sin embargo, MPTP no es causante por sí mismo de parkinsonismo. MPTP no causa ningún efecto por sí mismo, pero al ser metabolizado por la MAO-B se genera metilfenilpiridina (MPP+).

Cuando MPP+

entra en la célula bloquea la cadena respiratoria, conduciéndola a muerte por apoptosis. En el análisis post-mortem se hallaron Cuerpos de Lewi (CL) en la SNpc de estos pacientes.

Paraquat (PQ) también es un inductor de EP. PQ es uno de los pesticidas más utilizados en el mundo, aunque su uso ha quedado relegado a zonas emergentes tras demostrar su toxicidad para el ser humano. Se conoce que la exposición al herbicida paraquat de manera continuada induce parkinsonismo (Dinis-Olivera 2006). La estructura molecular del PQ es muy similar a la del metabolito MPP+ (**Figura 2**). La toxicidad de PQ se relaciona con fallos en la cadena respiratoria que inducen apoptosis celular (Niso-Santano, Moran et al. 2006). (Gonzalez-Polo, Niso-Santano et al. 2007).

El consumo de tabaco y alcohol parecen ser factores protectores frente a la EP (van der Mark, Nijssen et al. 2014).

Factores genéticos:

Se conoce una serie de genes implicados en la EP, que se denominan genes PARK. En este trabajo se ha puesto ha puesto la determinación de polimorfismos o mutaciones en cinco de ellos y su detección en una población de enfermos de Parkinson de Extremadura.

Epidemiología:

La EP es una de los trastornos de mayor prevalencia en la sociedad, es la segunda causa de enfermedad neurológica, siguiendo a la enfermedad de Alzheimer (EA). Actualmente afecta a un 0.3% de la población mundial. Tiene una prevalencia de más del 1% en individuos de hasta 55 años de edad. Este porcentaje aumenta con la edad; entre un 1-3% en la población mayor de 60 años, sobrepasa el 3% a partir de los 75 y alcanza valores de 3-4% al llegar a los 80 años. Siendo la edad uno de los factores de riesgo No hay acuerdo entre los diferentes estudios si es mayor la prevalencia en hombres que en mujeres.

Según datos de la Fundación Cerebro, la incidencia de la EP es de 8,2/100.000 habitantes/ año, siendo esta superior en varones (10,2/105 habitantes y año) respecto a las mujeres (4,02/105 habitantes y año). El rango de edad con mayor incidencia en varones está entre los 70-74 años. En mujeres en cambio aumenta de manera progresiva hasta los 85 años. La incidencia mundial de EP varía de 1,5-22

pacientes/100.000 habitantes al año. Este dato es equiparable a otros estudios de epidemiológicos realizados en todo el mundo, se concluye una incidencia anual de 17/100.000 habitantes y año (Garcia-Ramos, Lopez Valdes et al. 2013).

En España se registran 200 casos por cada 100.000 habitantes, cifras concordantes con datos del resto de Europa. En Extremadura el número de casos se incrementa hasta 266 enfermos por cada 100.000 habitantes. Este dato, dada la abundante industria agroganadera de nuestra comunidad, podría estar directamente relacionado con incremento de riesgo, antes mencionado, por exposición a plaguicidas.

1.2 Importancia del diagnóstico genético.

La genética médica es una herramienta muy valiosa, en la búsqueda por comprender el comportamiento de multitud de enfermedades de origen genético. Esta disciplina se aplica al diagnóstico en todas las etapas de la vida (diagnóstico prenatal hasta adulto), incluyendo todo tipo de trastornos, estudios de herencia familiar, mapeo de genes causantes y su localización en el cromosoma y análisis de los mecanismos moleculares que causan la enfermedad.

En la actualidad alrededor del 80% de las enfermedades raras son genéticas, se conocen entre 6.000 y 7.000 enfermedades consideradas raras con un marcado componente genético, de las cuales un alto porcentaje son hereditarias. La mayoría se catalogadas como "raras" por su baja frecuencia, menos de 5 casos por 10.000 personas según la definición de la Unión Europea. Todas ellas en conjunto tienen gran impacto en la sociedad se calcula que 6% de la población total de la Unión Europea se ve afectada en algún momento de su vida, ascendiendo a un 8% de la población mundial (L.B. Jorde, M.J.B. et al. 2011).

El número de enfermedades monogénicas (enfermedades hereditarias con alteración de un único gen) halladas en el ADN aumenta continuamente. A finales del año 2013, en el banco de datos OMIN (Online Mendelian Inheritance in Men), se encontraban registrados 22.000 trastornos clínicos. Actualmente contamos con 14.000 genes de secuencia conocida, 133 de secuencia-fenotipo conocido y 4.000 fenotipos cuyas bases moleculares también se conocen. Pese al amplio conocimiento en el campo logrado en los últimos años, son muchas las incógnitas que quedan por resolver (Health 2013).

El conjunto de enfermedades más frecuentes y de mayor impacto en la población, son las de componente multigénico y multifactorial. Este es el caso de la EP.

La probabilidad de que se produzca una enfermedad, como resultado de una mutación, es muy variable, no sólo están implicadas mutaciones poco frecuentes, sino también combinaciones de variaciones, que se dan con cierta frecuencia (polimorfismos). Además de existir los factores hereditarios e intervenir varios genes, también existe un marcado componente ambiental.

El diagnóstico genético es un proceso que abarca desde la historia clínica del paciente hasta el estudio genético y el consejo genético.

El fin de diagnóstico genético es identificar alteraciones o mutaciones en la secuencia de ADN que estén relacionadas con la enfermedad o con un aumento del riesgo de padecerla.

En los últimos años la genética se está aplicando a nivel diagnóstico y pronóstico en un gran número de enfermedades genéticas. Los avances de esta disciplina en el diagnóstico preciso, en la precocidad, prevención y caracterización de muchas enfermedades genéticas, va a permitir desarrollar nuevas estrategias terapéuticas y una medicina más personalizada, incrementando la calidad de vida de los pacientes, y la racionalización de las pruebas diagnósticas o determinadas medidas terapéuticas.

Los genes.

El término de gen fue acuñado por Johanssen en 1909 para denominar a la unidad básica de la herencia. Un gen es una porción de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica para proteína.

La posición fija que ocupa un gen en el cromosoma se denomina locus y cada una de las formas que puede tener un gen o locus se le denomina alelo. A la combinación de varios alelos distintos, locus que se heredan conjuntamente, se les denomina haplotipo (L.B. Jorde, M.J.B. et al. 2011).

Los genes están compuestos por ADN, es el material hereditario de los seres vivos, que aporta la información genética a todas las proteínas del cuerpo. El ADN, contiene de 35.000 a 42.000 genes distintos, número que está continuamente cambiando.

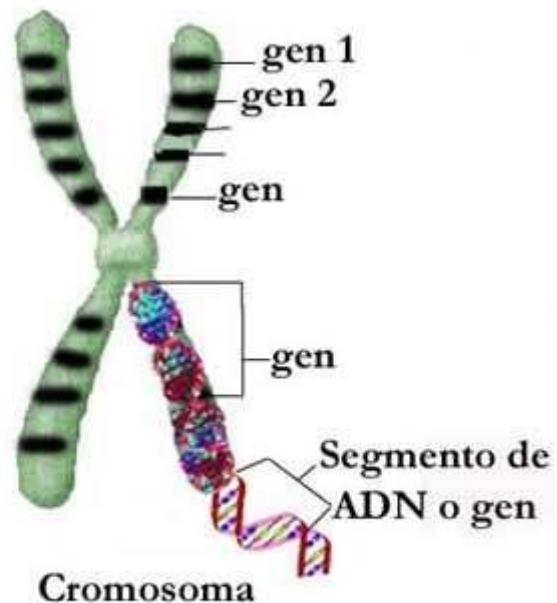


Figura 3: Plegamiento de la molécula de ADN

Las células del cuerpo de una persona con respecto a otra tienen el mismo ADN en un 98-99%. Toda la variedad surge de modificaciones en tan sólo un 1% estas son las mutaciones y los polimorfismos. Las mutaciones han tenido y tienen un papel crucial en la diversidad de las especies (especiación) y evolución. Los polimorfismos se han originado a partir de mutaciones que han tenido éxito y son ventajosas, y se han expandido en la población, es decir, son fruto de la evolución.

El ADN se localiza en el interior de la célula, en el núcleo y en las mitocondrias. La molécula de ADN, está formada por tres componentes básicos: la pentosa o azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada formando un nucleótido. Hay cuatro bases nitrogenadas repartidas en dos grupos, púricas y pirimidínicas, (**Figura 4**) (L.B. Jorde, M.J.B. et al. 2011).

La información contenida en el ADN se almacena con un código compuesto por estas cuatro bases químicas.

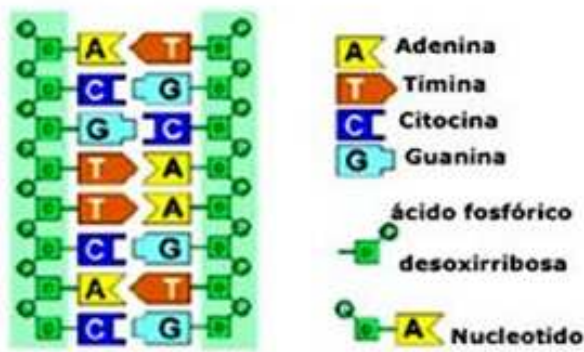


Figura4: Estructura básica del ADN y sus componentes. A: estructura simplificada de un nucleótido. B: Bases nitrogenadas

- Las bases púricas son adenina (A), guanina (G), están formadas por anillos dobles de carbono e hidrogeno.
- Las bases pirimidínicas son citosina (C) y timina (T), poseen un anillo sencillo formado por un esqueleto de carbono y nitrógeno.

Estas cuatro bases se representan con sus iniciales A, G, C, T. Cada célula humana contiene 6.6 billones de bases (**Figura 4**)

Una de las grandes contribuciones de Watson y Crick a mediados del s.XX, fue demostrar el modo en que estos componentes se ensamblan para formar el ADN (L.B. Jorde, M.J.B. et al. 2011). El ADN humano se compone de alrededor de 2,85 billones de bases,(Jarvi and Chitayat 2008). Los nucleótidos se emparejan entre si, A - T y C - G, formando el ADN bicatenario, se unen entre sí mediante puentes de hidrógeno dobles y triples respectivamente. El ADN posee dos largas hebras unidas formando una estructura de doble hélice. Una propiedad significativa del ADN es que puede replicarse o hacer copias de sí mismo. Cada cadena de ADN de la doble hélice

sirve como molde para la duplicación de la secuencia. Así las células cuando se dividen presentan una cadena parental y otra de nueva síntesis.

EL ADN se compacta en 44 autosomas y 2 cromosomas sexuales, los genes se organizan en exones e intrones. A todos los exones lo flanquean secuencias intrónicas (Health 2013). Esta estructura del ADN, intrón-exón fue descubierta en 1977, es uno de los atributos que distingue los eucariotas de los procariotas.

Alteraciones en la secuencia de ADN

Las enfermedades neurológicas son genéticamente heterogéneas. Entre las diferentes alteraciones podemos distinguir dos grupos principales: polimorfismos y mutaciones.

Los polimorfismos son variaciones genéticas que encontramos en el ADN cuya frecuencia es de al menos el 1% en la población (Jarvi and Chitayat 2008). Si comparamos el genoma de diferentes individuos encontramos diferencias, cambios en la secuencia de ADN que en la mayoría de los casos no modifican al fenotipo, aunque algunos, no siendo la única causa del rasgo, participan en él. Esto es lo que se conoce como polimorfismo genético. Consiste por tanto en la coexistencia de varias formas de un mismo gen (alelos) en un locus dado en una población

Las variaciones en el ADN que causan enfermedad se suelen dar en: exones codificantes (causan un efecto en la proteína), exones no codificantes (participa en la regulación postraducciona), intrones (efectos de “splicing” o niveles de ARN mensajero), uniones exón-intrón (afectan al “splicing” y la composición de la proteína), promotores y regiones reguladoras (afectan a la regulación de la expresión génica), en las extensas regiones cromosómicas (causan desequilibrios de dosis génica) (Health 2013). También presentan mutaciones los promotores, las regiones 5' UTR (inicio traducción). Afectando a distintas etapas de la expresión génica.

Algunas de las modificaciones que podemos encontrar son:

- **Cambios de nucleótido:** Una base es sustituida por otra distinta. Las transversiones son cambios de una base púrica por pirimidínica o al contrario. Las transiciones son cambios de bases púricas por púricas o pirimidínicas por pirimidínicas. El cambio de una sola letra puede producir un cambio de un aminoácido por otro, provocando un cambio en la función de la proteína o cambio en la fase de lectura, llegando a un codón stop.

Las *variantes sinónimas (Synonymous Variant)*, es un cambio en un solo par de bases de ADN, sin afectar a un cambio de aminoácido.

En las *mutaciones sin sentido (nonsense)* se produce un cambio de un par de bases en el ADN que provoca que aparezca un codón de parada, que trunca la proteína. Da lugar a una proteína acortada que tiene afectada su funcionalidad.

- **Grandes reorganizaciones:** Ganancias, pérdidas o reorganizaciones de fragmentos de ADN.
- **Mutaciones dinámicas:** Repetición inestable de un triplete de nucleótidos en distintas regiones de un gen. distintas secuencia de trinucleótidos repetidos se asocian con más de 12 diferentes enfermedades neurológicas distintas, como por ejemplo la enfermedad de Huntington (Jarvi and Chitayat 2008).
- **Duplicación:** consiste en que un fragmento de ADN, se copia anormalmente una o más veces. Este tipo de mutación puede alterar la función de la proteína resultante.
- **“Variant frameshift”:** es una mutación que se produce cuando la adición o pérdida de bases del ADN produce cambios en el marco de lectura del gen. Un marco de lectura consiste en grupos de tres bases que codifican la señal para un aminoácido. Una mutación de desplazamiento de marco, desliza la agrupación de estas bases y cambia el código para los aminoácidos. La proteína resultante es por lo general no funcional.

1.3 Genética de la Enfermedad de Parkinson:

La Neurogenética es una disciplina que contempla simultáneamente la Neurología, Genética y Neurociencias, se basa en el estudio de los trastornos neurológicos hereditarios y las bases moleculares del sistema nervioso.

Aproximadamente dos millones de Españoles están afectados de una patología neurológica hereditaria.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la muerte progresiva de neuronas en diferentes regiones del sistema nervioso y el consiguiente deterioro funcional de las partes afectadas.

Hasta ahora se sabe que hasta un 10% de los casos de parkinsonismo son de origen genético. Estas alteraciones genéticas se presentan, de forma esporádica y de forma familiar (Health 2013) (hay familiares que también tienen la mutación). Del 10 al 25% de los casos aparece un patrón determinado de herencia familiar. En el porcentaje restante, al no aparecer ninguna mutación, o no presentar ningún patrón de herencia identificable, se les denomina *esporádicos*.

Como el origen de la EP es heterogéneo el riesgo general de la población a padecer Parkinson es de 1% a 2%, si contamos los antecedentes familiares, asciende de 3% a 7%. Por otra parte, se han detectado mutaciones y polimorfismos en 16 genes, llamados genes PARK (**Tabla 1**) que se relacionan con la EP, hay genes causales, y pre disponentes.

La genética nos sirve para comprender la composición biológica fundamental de un organismo y así nos permite obtener una mayor comprensión del proceso patológico(L.B. Jorde, M.J.B. et al. 2011).

Locus	Gen	Mapeo cromosómico	Estructura génica	Herencia	Fenotipo clínico	Genética molecular
PARK1	SNCA	4q21	6exones 111kb	Autosómica dominante (AD) y esporádico	Parkinsonismo asociado a demencia (mutaciones puntuales). Degeneración de la SNpc con CL.	Mutación causante de la EP.
PARK2	PRKN	6q25.2-q27	12 exones 500kb	Autosómica recesiva (AR) y esporádica	Parkinsonismo de inicio temprano. Degeneración de la SNpc.	Mutación causante de EP.
PARK3		2p13		AD	Parkinsonismo y demencia con CL.	
PARK4	SNCA1		Igual que PARK1	AD	Demencia con CL.	Sobreexpresión del gen.
PARK5	UCHL1	4p14	9 exones 10kb	AD	Parkinsonismo y demencia.	Mutación, disfunción enzimática.
PARK6	PINK1	1p35-36	8 exones 1,8kb	AR	Parkinsonismo de inicio temprano, síndrome piramidal, distonia y otros.	Mutación, disfunción enzimática.
PARK7	DJ1	1p36	8 exones 24kb	AR y esporádico	Parkinsonismo de inicio temprano	Mutación sobreexpresión de la proteína
PARK8	LRRK2	12q12	52exones 144kb	esporádico	Parkinson, degeneración de la sustancia negra, CL, rara vez taupatologías.	Mutación, disfunción enzimática.
PARK9	ATP13A2	1p36	29 exones 26kb	AR	Parkinson de inicio temprano, demencia, disfunción, síndrome psiquiátrico, signo piramidal y Parkinson	Mutación, pérdida de función.
PARK10		1p32		AD	Parkinson	
PARK11	GYGF2	2q36-37		AD	Parkinson	
PARK12		2q21-q25		AD		
PARK13	Onmi/htra2	2p12	8 exones 3,8kb	AD	Parkinson	Mutación por defecto de la actividad de la protease.
PARK14	PLA2G6	22q13.1		AR	Parkinson de inicio temprano, demencia, espasticidad, distonia, signo piramidal, CL y taupatologías	
PARK15	FBX07	22q12-q13	12 exones	AR	Parkinson de inicio temprano y espasticidad.	
PARK16	GBA	1q32		AR		

Tabla 1: Genes implicados en EP

PARK1 – PARK4: α -sinucleína (SNCA)

α - sinucleína, es una proteína que compone mayoritariamente los CL. Éstos son inclusiones citoplasmáticas halladas, post-mortem, en la SNpc de pacientes con enfermedad de párkinson (Singleton, Farrer et al. 2003).

Las mutaciones en SNCA confieren a la proteína un plegamiento erróneo que hace que precipite y forme, junto con otras como la ubiquitina, los CL.

El fenotipo clínico de estos pacientes se caracteriza por un inicio temprano y progresión rápida, presentan alta prevalencia de demencia y alteraciones psiquiátricas. Se cree que los cambios en la expresión o la presencia de mutaciones en SNCA tienen efectos neurotóxicos en las neuronas dopaminérgicas. Los monómeros de α -sinucleína forman fibrillas y protofibrillas que son letales para las neuronas productoras de dopamina en la sustancia negra.

Fue el primer gen hallado con relación a la EP analizado en 1996 en pacientes de origen italiano con una forma autosómica de la enfermedad.

Las mutaciones en el gen *SNCA*, son raras. Se conocen: mutaciones puntuales “missense” (de sentido erróneo), variantes en la proteína codificada, y multiplicaciones de todo el locus (duplicaciones o triplicaciones) que conduce a la sobreexpresión severa de la proteína de tipo salvaje (Polymeropoulos, Lavedan et al. 1997; Singleton, Farrer et al. 2003). Estas duplicaciones o triplicaciones afectan al 1-3% de los pacientes afectados por EP con herencia autosómica dominante. Las mutaciones puntuales y triplicaciones son excesivamente raras.

En 2003, una triplicación del locus silvestre *SNCA* (Miller, Hague et al. 2004) se observó en una gran familia multigeneracional (Singleton, Farrer et al. 2003). Sin embargo, también se informó de regiones duplicadas o triplicadas de igual tamaño rodeando al gen *SNCA* entre diferentes familias o dentro de las ramas de la misma familia (Nishioka, Ross et al. 2009). De interés es que también se registraron duplicaciones de este gen en cuatro pacientes aparentemente esporádicos de EP (Ibanez, Bonnet et al. 2004; Nishioka, Ross et al. 2009), estos fenómenos también se creen que son raros. Un meta-análisis ha proporcionado pruebas de que la variabilidad de alelos longitud en una secuencia de repeticiones de dinucleótido en el gen *SNCA* (denominado *SNCA REP1*) se asocia con un mayor riesgo de EP (Maraganore, de Andrade et al. 2006).

PARK2: Parkina (PRKN).

La proteína parkina, se encuentra en la sinapsis neuronal. Forma parte de complejo multiproteico E3 ubiquitin ligasa. Este, forma parte del sistema ubiquitin-proteasoma, participando en el marcaje de proteínas para degradación.

Las mutaciones en este gen dan lugar a una proteína no funcional, por lo que se alteran el proceso de ubiquitinación y lleva a las neuronas de SNpc a la muerte. Se caracteriza, por la degeneración de este área con ausencia de CL.

Las variaciones homocigotas en PARK2 se asocian a formas juveniles de la enfermedad, apareciendo el síndrome a una media de 30 años.

La progresión de la enfermedad es simétrica, lenta, con distonía de inicio en los pies, hiperreflexia, la terapia con levodopa produce buena respuesta, pero a veces induce complicaciones motoras, como las disquinesias (Kitada, Asakawa et al. 1998; Lucking, Durr et al. 2000).

Pese a ser de inicio juvenil se han descrito casos en los que puede presentarse de forma inusual la enfermedad de forma tardía (Abbas, Lucking et al. 1999; Klein, Pramstaller et al. 2000), a una edad similar a la EP típica, pero avanzando rápidamente.

El locus PARK2 se sitúa en el cromosoma 6q. Es el primer gen descubierto con herencia recesiva relacionado con la forma de inicio juvenil. Se halló por primera vez en una familia japonesa con numerosas uniones consanguíneas en el año 1998.

Las mutaciones en *PARK2* explican la mitad de los casos de EP familiar compatibles con herencia recesiva y enfermedad de inicio antes de la edad 30-45 años, y también aproximadamente el 15% de los casos esporádicos con inicio antes de los 45 años. Mutaciones en este gen causan EP y parkinsonismo juvenil de herencia autosómica recesiva, siendo identificada en muchas familias recientemente e incluso en casos aislados de inicio temprano. En un largo estudio europeo se analizaron todas las mutaciones que se conocen en *PARK2*. En el estudio se concluye que la mitad de las mutaciones se relacionan con casos familiares de parkinsonismo juvenil (inicio antes de los 40) (Lucking, Durr et al. 2000) y aproximadamente 15-20% corresponden a casos esporádicos de inicio temprano (Lucking, Durr et al. 2000; Singleton, Farrer et al. 2013).

PARK6: PINK-1

La función de la proteína PINK1 no se conoce aún con exactitud, parece ser que está relacionada con mecanismos de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo o aumento de los requerimientos energéticos de la célula.

El gen PARK6, encargado de la transcripción de esta proteína, está compuesto por 8 exones, se encuentra en el locus 1p35-36. Es el segundo gen de herencia Autosómica recesiva en relevancia después de PARK2.

Clínicamente la mayoría de pacientes con mutaciones en PINK1 desarrollan parkinsonismo antes de los 40 años, responden bien al tratamiento con L-DOPA, tienen complicaciones motoras tempranas, aunque la progresión es lenta. Es frecuente encontrar síntomas atípicos y una elevada prevalencia de trastornos psiquiátricos en pacientes con mutaciones en este gen. (Li, Tomiyama et al. 2005). Este fenotipo es similar al de PARK2, pero los síntomas psiquiátricos ocurren más frecuentemente en *PINK1*.

En el análisis post-mortem de pacientes de Parkinson con mutaciones en PINK1 se aprecia la disminución de neuronas de la vía nigroestriada con presencia de CL(Gandhi, Muqit et al. 2006).

Es menos frecuente encontrar pacientes con mutaciones en PINK1, en torno al 1%, que en PARK2, hasta el 15%.

PARK8: LRRK2

El gen LRRK2 fue descubierto en 2004, es el segundo gen causal asociado a enfermedad autosómica dominante (Funayama, Hasegawa et al. 2002; Paisan-Ruiz, Jain et al. 2004; Zimprich, Biskup et al. 2004) y representa la causa más común de EP identificada hasta la fecha (Di Fonzo, Rohe et al. 2005; Gilks, Abou-Sleiman et al. 2005; Kachergus, Mata et al. 2005; Nichols, Pankratz et al. 2005). Las mutaciones en LRRK2 constituyen el 7% de los casos de Parkinson familiar y en el 1% de los casos esporádicos (Farrer 2006)].

La proteína mutada LRRK2 Induce apoptosis de neuronas dopaminérgicas. Mutaciones en este gen se han asociado a la EP típica, de inicio tardío familiar o de inicio espontáneo. Las primeras mutaciones patogénicas descritas se dieron en

familias de origen europeo y americano. Las primeras mutaciones halladas fueron R1441G, R1441C, G2019S, Y1699C y I2020T (Paisan-Ruiz, Jain et al. 2004; Zimprich, Biskup et al. 2004).

La mutación G2019S se ha determinado en toda la población, pero la frecuencia de aparición es mayor en individuos de origen europeo (Di Fonzo, Rohe et al. 2005; Lesage, Durr et al. 2006). Es la mutación con mayor penetrancia y frecuencia, con un efecto fundador descrito por todo el mundo, con un promedio de frecuencia de 1% en pacientes con EP (Paisan-Ruiz 2009). Sin embargo, la distribución de esta mutación es diferente a lo largo de las poblaciones, es más prevalente en Oriente Medio y norte de África. Generalmente esta mutación disminuye cuanto más nos alejamos de la zona mediterránea (Bardien, Lesage et al. 2011). En el norte de España se han descrito entre 3-18% en casos familiares y esporádicos de la enfermedad (Gaig, Ezquerro et al. 2006; Infante, Rodríguez et al. 2006; Mata, Ross et al. 2006).

PARK16: GBA Glucocerebrosidasa.

La glucocerebrosidasa (GBA) es una enzima lisosomal, encargada de la degradación de lípidos complejos, los glucoesfingolípidos. Estos están formados por un grupo ceramida (esfingosina + ácido graso) unido a una molécula de azúcar, en el caso del glucocerebrósido una glucosa. La Enfermedad de Gaucher (EG) es causada por el déficit de GBA.

Las mutaciones homocigóticas en PARK16 hacen que la GBA sintetizada sea disfuncional. La consecuente acumulación de glucocerebrósido afecta principalmente a los macrófagos (células de Gaucher) que tienden a acumularse en ciertos tejidos como bazo, hígado y médula ósea. Es una enfermedad grave de inicio temprano. Hay tres tipos de EG (1,2 y 3), con manifestaciones ligeramente diferentes.

La relación entre EG, raro error innato del metabolismo habitual en los Judíos Asquenazíes (AJ), y la EP aún no está clara. Se ha observado que las pocas personas con EG que sobreviven hasta la vida adulta desarrollan parkinsonismo. Análisis post mortem han revelado la presencia de CL en el cerebro. (Goker-Alpan, Schiffmann et al. 2004)

Alteraciones en el genoma de tipo heterocigoto en PARK16 parecen estar relacionadas con el desarrollo de EP. Aún no se conoce en profundidad el mecanismo

por el que esta mutación contribuye al desarrollo de la enfermedad. Las hipótesis apuntan a su relación con la función lisosomal en células productoras de dopamina. La presencia de mutaciones en GBA aumenta el riesgo de desarrollar la enfermedad de Parkinson, más de cinco veces. (Goker-Alpan, Schiffmann et al. 2004).

Los AJ con enfermedad de Parkinson tienen un 30% de probabilidad de llevar o bien una mutación en GBA o en LRRK2; Por lo tanto estos genes de susceptibilidad deben ser consideradas como factores de riesgo importantes en este grupo étnico. (Gan-Or, Giladi et al. 2008; Sidransky, Nalls et al. 2009)

Hemooxigenasa-1 (HO-1)

La HO-1 es una enzima que cataliza la escisión del grupo hemo en CO, Fe y biliverdina. Presenta dos isoformas, HO-1 y HO-2. La expresión de HO-1 confiere protección en varias líneas celulares. En ensayos con modelos animales se observa la activación del gen para HO-1 como mecanismo de defensa ante situaciones de estrés oxidativo (Scapagnini, D'Agata et al. 2002).

En análisis post-mortem en cerebro, se ha encontrado que la expresión de HO-1 esta aumentada, no sólo en pacientes con EP, también con EA y enfermedad de Huntington. No se conoce con exactitud la causa pero podría estar contribuyendo a una acumulación de hierro en las mitocondrias (Schipper 2004).

Por otro lado estudios realizados en ratones prueban que disminuye la muerte celular en ratones transgénicos y en cultivos neuronales expuestos a compuestos neurotóxicos.

. Recientemente se ha relacionado el genotipo TT con una mayor susceptibilidad en la exposición a exposición a pesticidas (Infante, Sierra et al. 2011). Es necesario continuar con el estudio del papel de la HO-1 en las enfermedades neurodegenerativas.

2

Objetivos.

Los objetivos propuestos para la realización de este trabajo son los siguientes:

1. Diseño y Puesta a punto de las técnicas de biología molecular precisas para la detección de varios polimorfismos y mutaciones asociadas a la enfermedad de Parkinson. (PARK 1, PARK 2, PARK6, PARK 8, PARK 16 y hemooxigenasa-1)
2. Aplicación de las técnicas anteriores a la detección de estos polimorfismos y mutaciones en una población de enfermos de Extremadura.

3

Material y métodos.

3.1 MATERIALES.

3.1.1 Equipos.

- Agitador vortex tubos Bunsen.
- Autoclave Rayppa Steam Sterilizer.
- Balanza de precisión A&D EK-200i.
- Balanza analítica ADAM modelo PW 124.
- Balanza electrónica AND modelo GF 300.
- Baño termostático Bunsen serie BA.
- Baño ELMI Sky Line.
- Biodestilador MILLIPORE modelo Direct Q5 Ultrapure Water Systems.
- Campana UVC/T-AR, DNA/RNA UV-cleaner box.
- Campana DNA/RNA *UV-cleaner* box, *UVC/T-AR*.
- Centrífuga refrigerada de mesa Heraeus modelo Megafuge 1.0R.
- Centrífuga refrigerada de mesa Hermle modelo Z 36 HK.
- Congelador a -20 °C Edesa modelo Practica.
- Congelador a -80 °C Heraeus modelo HERA freeze.
- Congelador a -80 °C Thermo Scientific modelo Forma 994.
- Equipo de electroforesis iMupid Mini Agarose Gel Electrophoresis System.
- Equipo de electroforesis Mupid-One electrophoresis system.
- Espectrofotómetro Thermo Scientific modelo NanoDrop 2000.
- Frigorífico a 4 °C y -20 °C Edesa modelo StyleGel Doc 2000 BioRad.
- Máquina de hielo granizado Scotsman modelo AF80.
- Minicentrífuga Labnet Mini Centrifuge C-1200.

- Microcentrífuga Mikro 20.
- Microcentrífuga Qualitron modelo DW 41.
- Minicentrífuga Strip-Fuge, AC input 230 V.
- PCR Ecoillumina.
- PCR i 7500 Applied-Biosystems.
- pH-metro CRISON modelo GLP21.
- Termociclador T100 Thermal Cyclar Biorad.
- Termostato de bloque metálico Bunsen serie TMR.
- Termostato de termobloque metálico AccuBlock™ Digital Dry Baths.
- Transiluminador UVP.

3.1.2 Reactivos:

- Laboratorios Ambion:
 - Water RNAase free.
- Laboratorios Applichem:
 - DNA ladder 100bp
- Laboratorios Biorad:
 - Certified Low Range Ultra agarose.
 - Certified Molecular Biology agarose10x TBE Extended Range.
- Laboratorios Costar:
 - Tubos microcentrífuga 1,7, 0.5, 0.2 ml.
- Laboratorios Daslab-Nirco:
 - Tubos microcentrífuga de 1,5 y 2 ml.

- Laboratorios Ecogen:
 - EcoTaq DNA polimerasa.
 - dNTPs Mix. Cloruro de Magnesio (II) 50mM
 - Tampón 10x
 - Tampón 10X NH₄ no
 - Cl₂Mg

- Laboratorios Favorgen
 - 6x loading dye

- Laboratorios Fermentas:
 - Enzima de restricción Xho1.
 - Enzima de restricción NciI
 - 10xgreen buffer
 - Gene JET Genomic DNA purification Kit.

- Laboratorios IDT:
 - Primers Fw/Rv SNCA EXÓN 1
 - Primers Fw/Rv SNCA EXÓN2
 - Primers Fw/Rv PARK2 EXÓN 2.
 - Primers Fw/Rv PARK2 EXÓN 3.
 - Primers Fw/Rv PARK2 EXÓN 4.
 - Primers Fw/Rv PARK2 EXÓN 5.
 - Primers Fw/Rv PARK2 EXÓN 6.
 - Primers Fw/Rv PARK2 EXÓN 7.
 - Primers Fw/Rv PARK2 EXÓN 8.

- Primers Fw/Rv PINK1 EXÓN 2.
- Primers Fw/Rv PINK1 EXÓN 3.
- Primers Fw/Rv PINK1 EXÓN 4.
- Primers Fw/Rv PINK1 EXÓN 5.
- Primers Fw/Rv PINK1 EXÓN 6.
- Primers Fw/Rv PINK1 EXÓN 7.
- Primers Fw/Rv LRRK2 EXÓN 31
- Primers Fw/Rv LRRK2 EXÓN 41.
- Primers Fw/Rv GBA N370S
- Primers Fw/Rv GBA L444P
- Laboratorios intrón:
 - RedSafe Nucleic Acid Staining Solution.
 - 100bp BLUE DNA ladder.
- Laboratorios isogen:
 - ExoSap IT.
- Laboratorios MN:
 - Nucleospin Gel and PCR clean-up.
- Laboratorios sigma:
 - Diethyl pirocarbonato 97% NMR.
 - Glicerol for molecular biology minimum 99%.
 - PCR 20 bp low ladder.
 - Water for Biology Molecular.

- Laboratorios Panreac:
 - Etanol Absoluto.
 - Metanol.
 - 2-propanol.
- Laboratorios Takara:
 - 100bp DNA ladder dye plus.
- Laboratorio thermofisher:
 - Dream Taq PCR Master Mix.
 - Punta pipeta 1000µl, 1-200 µl, 0,1-10 µl (con filtro).
 - Punta 0,1-10 µl (Sin filtro, Punta larga, punta corta).
- Laboratorios 5-PRIME:
 - Archivepure DNA Blood kit.

3.2 Métodos

3.2.1 Métodos bioinformáticos.

1. Selección de los genes objeto de estudio.

Se realizó una detallada revisión bibliográfica de los genes identificados en la actualidad involucrados en la EP. Se revisaron varias bases de datos, donde se recoge información de todas las mutaciones y variaciones identificadas para cada gen con significado clínico patológico y otras aún desconocidas.

Entre estas bases de datos destacan “GeneWindow” (<http://genewindow.nci.nih.gov/Welcome>) y “Ensamble Genome Browser” (<http://www.ensembl.org/index.html>). La base de datos elegida para realizar este trabajo ha sido esta última, en la que introduciendo el código de gen y seleccionando “Human”, detalla la localización de los genes, los exones y la región intrónica al completo. En ella se muestran por colores todas las variaciones, tanto intrónicas como exónicas. Incluye también su localización, frecuencia en la población, significado patológico y si ha sido descrita en alguna ocasión. Al igual que nos da la identidad de la mutación, nos da la del gen, de la proteína, de los transcritos que se producen, y el tamaño de todos los transcritos en pares de bases (pb) y aminoácidos.

2. Diseño de primers.

Una vez seleccionados los genes objeto del estudio, se procede al diseño de primers utilizando el software científico Primer 3.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) es una aplicación gratuita que se encuentra en diferentes servidores web.

Este programa bioinformático básico sirve para diseñar y analizar una pareja de primers para ser usado en PCR y secuenciación.

Un correcto diseño de los primers es fundamental y de gran importancia para proseguir con el estudio, y se lleve a cabo la PCR a partir del ADN molde de interés, utilizando esta pareja de primers, que delimita la zona del ADN que queremos amplificar. Si el diseño es el correcto, obtendremos mayor calidad y cantidad del producto de amplificación. Necesitamos que el producto de PCR tenga muchas copias del fragmento de ADN o exón que queremos analizar.

Los primers deben ser específicos, con una longitud determinada, de modo que tengan una secuencia única dentro del ADN. Si esta secuencia se repite en otras zonas del ADN dará lugar a productos no deseados. Algunos de los parámetros más comunes que hemos de tener en cuenta a la hora del diseño de los primers son: cálculo correcto de la temperatura, longitud de los primers, comparación de primers entre sí y entre ellos, para que no se produzcan dímeros de primers y autoalineamientos. El diseño cuidadoso de primers es uno de los aspectos más importantes de la PCR y se deben regir por una serie de reglas que se enumeran a continuación. Las características que deben presentar los primers son las siguientes:

- a)** Cada primer debe contar con una longitud de 18-24 bases.
- b)** Se debe mantener un contenido de GC (Guanina: Citosina) entre 40 y 60%. Nunca más del 80%. Y sobre todo en los últimos 5 nucleótidos no demasiadas G/C.
- c)** Los dos primers del par deben de tener temperatura de fusión "T_m" cercanos, dentro de los 5 °C.
- d)** La secuencia individual de los primers debe iniciarse y terminarse con 1 ó 2 bases púricas.
- e)** Evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas.
- f)** Secuencias adicionales pueden ser agregadas en el extremo 5' del primer (no incluir cuando se estima la T_m del primer).
- g)** Se pueden agregar degeneraciones en algunas posiciones del primer:
 - Se incrementa el riesgo de amplificación inespecífica.
 - Se disminuye la concentración en la mezcla de cada uno de los primers posibles
 - No se recomienda utilizar más de 64 primers diferentes en la mezcla.
- h)** La T_m normalmente es mayor o igual a 58 °C. El óptimo normalmente es 60°C aunque depende de cada primer.

Cuanta más especificidad existe, menor es el rendimiento.

- i) Las terminaciones 3' no deben ser complementarias para no formar dímeros.
- j) En el extremo 3' no debe haber Gs.
- k) Al escoger la región de ADN que queremos amplificar, hay que dejar 20 nucleótidos antes del exón a amplificar para optimizar la lectura del secuenciador.
- l) Cuando diseñamos los primers tenemos que evitar que existan polimorfismos en la población en la región del ADN a la que se van a unir estos.
- m) Una vez diseñados los primers hay que comprobar su correcto diseño en el programa BLAST ncbi, para saber en qué parte del genoma humano se adhiere el primer diseñado, puede ser de mayor o menor afinidad. A menor valor de E, mayor afinidad, los primers deben unirse por la región central a su ADN molde y no por los extremos.

Primer 3.0 es una aplicación que se encuentra libre para su uso en diferentes servidores web. Permite especificar un gran número de variables y obtener primers según las indicaciones solicitadas. Además permite agregar el número de acceso de la secuencia, que se halla en las bases de datos internacionales, discriminar las regiones de la secuencia que se deben incluir, las que se deben excluir y el rango de tamaños del producto. Por otra parte, el software incluye la posibilidad de especificar las características mínimas de los primers deseados, como Tm, porcentaje de GC, máxima autocomplementariedad, y otros parámetros.

En primer lugar necesitamos buscar la secuencia del gen de interés, utilizamos la base de datos "Ensemble Genomic Browser". De ahí obtenemos la secuencia de bases del exón así como una parte de los intrones que lo flanquean. Esta secuencia es la que vamos a introducir en Primer 3.0 junto con todos los datos necesarios que este solicite.

3. Selección de genes y transcritos.

Tras realizar una revisión bibliográfica y consultar varias bases de datos hemos seleccionado los genes que van a ser objeto de estudio para el diagnóstico genético en la EP por secuenciación (**Tabla 2**).

GEN	EXÓN	TRANSCRITO	A	B	PRIMERS
<i>PARK1</i>	1	GGAGGACGGCGACG ACCAGAAGGGGCCC AAGAGAGGGGGCGA GCGACCGAGCGCCG CGACGCGGAAGTGA G	68	431	Forward: caggcggctggagttgat Reverse: gcaaaccgctaacctgtc
	2	TGTGGTGTAAAGGAA TTCATTAGCCATGGA TGTATTCATGAAAGG ACTTTCAAAGGCCAA GGAGGGAGTTGTGG CTGCTGCTGAGAAAA CCAAACAGGGTGTG GCAGAAGCAGCAGG AAAGACAAAAGAGGG TGTTCTCTATGTAG	144	446	Forward: tgtctgctttgtccaatggt Reverse: tgacaagcaatgatgcaaaa
<i>PARK2</i>	2	TGTTTGTCAGGTTCA ACTCCAGCCATGGTT TCCCAGTGGAGGTC GATTCTGACACCAGC ATCTTCCAGCTCAAG GAGGTGGTTGCTAAG CGACAGGGGGTTCC GGCTGACCAGTTGC GTGTGATTTTCGCAG GGAAGGAGCTGAGG AATGACTGGACTGTG CAGGGGCTGGCTGT CATTCTGCACACTGA CAGCAGGAAGGACT CACCACCAGCTGGAA GTCCAG	159	411	Forward: gaggggtaaatacggttgaga Reverse: cagaattaatgaagcagtggtga

4	<p>CAGGTAGATCAATCT ACAACAGCTTTTATG TGTATTGCAAAGGCC CCTGTCAAAGAGTGC AGCCGGGAAAACCTCA GGGTACAGTGCAGC ACCTGCAGGCAGGC AACGCTCACCTTGAC CCAG</p>	120	411	<p>Forward: ttcaaaatgttcctgaagactga Reverse: aagacaaaggcgcataaacg</p>
5	<p>GGTCCATCTTGCTGG GATGATGTTTTAATTC CAAACCGGATGAGTG GTGAATGCCAATCCC CACACTGCCCTGGG ACTAGTGCA</p>	83	440	<p>Forward: tgacctagcacatcccttga Reverse: gcacaggttgaattttggt</p>
6	<p>GAATTTTTCTTTAAAT GTGGAGCACACCCC ACCTCTGACAAGGAA ACACCTGATCGCAAC AAATAGTCGGAACAT CACTTGCATTACGTG CACAGACGTCAGCAT CAGTAGCTTTG</p>	114	428	<p>Forward: actttggcacaaggatcatcc Reverse: tccccaggaaagagagtca</p>
7	<p>ATTTGCTTAGACTGT TTCCAATTATACTGT GTGACAAGACTCAAT GATCGGCAGTTTGTT CACGACCCTCAACTT GGCTACTCCCTGCCT TGTGTGG</p>	96	452	<p>Forward: ctagcagctccggtctttg Reverse: caattcctcattccccaga</p>
8	<p>CTGGCTGTCCCAACT CCTTGATTAAGAGC TCCATCACTTCAGGA TTCTGGGAGAAGAGC AG</p>	61	413	<p>Forward: tctttgagggtttggcttt Reverse: Ggtctgatggatagaagaggaa aa</p>

<i>PARK6</i>	2	<p>GCAATTTTTACCCAG AAAAGCAAGCCGGG GCCTGACCCGTTGG ACACGAGACGCTTGC AGGGCTTTCGGCTG GAGGAGTATCTGATA GGGCAGTCCATTGGT AAGGGCTGCAGTGC TGCTGTGTATGAAGC CACCATGCCTACATT GCCCCAGAACCTGG AGGTGACAAAGAGCA CCGGGTTGCTTCCAG GGAGAGGCCCAGGT ACCAGTGCACCAGG AGAAGGGCAGGAGC GAGCTCCGGGGGCC CCTGCCTTCCCCTTG GCCATCAAGATGATG TGGAACATCTCG</p>	283	472	<p>Forward: accaggctgagcagtagaa Reverse: gatgaaaggcctggtgctta</p>
	3	<p>GCAGGTTCCCTCCAGC GAAGCCATCTTGAAC ACAATGAGCCAGGA GCTGGTCCCAGCGA GCCGAGTGGCCTTG GCTGGGGAGTATGG AGCAGTCACTTACAG</p>	100	419	<p>Forward: tctcgaaggtcagagccaat Reverse catcatcattggggtcaga</p>

4	<p>AAAATCCAAGAGAGG TCCAAGCAACTAGC CCCTCACCCCAACAT CATCCGGGTTCTCCG CGCCTTCACCTCTTC CGTGCCGCTGCTGC CAGGGGCCCTGGTC GACTACCCTGATGTG CTGCCCTCACGCCTC CACCCTGAAGGCCT GGGCCATGGCCGGA CGCTGTTCTCGTTA TGAAGAA</p>	180	403	<p>Forward: tgatgctggcctcatatggt Reverse: tcgtcctacagggaaaatgc</p>
5	<p>CTATCCCTGTACCCT GCGCCAGTACCTTTG TGTGAACACACCCAG CCCCCGCCTCGCCG CCATGATGCTGCTGC AGCTGCTGGAAGGC GTGGACCATCTGGTT CAACAGGGCATCGC GCACAGAGACCTGAA ATCCGACAACATCCT TGTGGAGCTGGACC CAG</p>	162	414	<p>Forward: attgggagtcgctgatgtgt Reverse: gggaagtgtctctctctgc</p>
6	<p>ACGGCTGCCCTGG CTGGTGATCGCAGAT TTTGGCTGCTGCCTG GCTGATGAGAGCATC GGCTGCAGTTGCC CTTCAGCAGCTGGTA CGTGGATCGGGGCG GAAACGGCTGTCTGA TGGCCCCAGAG</p>	126	415	<p>Forward: ccattagcccctgtcagcta Reverse: ctctggaacatgagggaac</p>

	7	GGGCAGTGGGAGCC ATCGCCTATGAAATC TTCGGGCTTGTC AAT CCCTTCTACGGCCAG GGCAAGGCCACCT TGAAAGCCGCAGCTA CCAAGAGGCTCAGCT ACCTGCACTGCCCGA GTCAGTGCCTCCAGA CGTGAGACAGTTGGT GAGGGCACTGCTCC AGCGAGAGGCCAGC AAG	176	413	Forward: gcaggacatgaaaaggtagatg Reverse: ttcctaacacagaggatctgtca
PARK8	31	GCTCGCGCTTCTTCT TCCCCTGTGATTCTC GTTGGCACACATTTG GATGTTTCTGATGAG AAGCAACGCAAAGCC TGCATGAGTAAAATC ACCAAGGAACTCCTG AATAAGCGAGGGTTC CCTGCCATACGAGAT TACCACTTTGTGAAT GCCACCGAGGAATCT GATGCTTTGGCAAAA CTTCGGAAAACCATC ATAAACGAGAGCCTT AATTTCAAG	210	401	Forward: ttcaagtgaatgtcacggaaag Reverse: gtgagttgctcacttctcaaaa

	41	<p>ATACCTCCTCACTCAGC CATGATTATATACCG AGACCTGAAACCCCA CAATGTGCTGCTTTT CACACTGTATCCCAA TGCTGCCATCATTGC AAAGATTGCTGACTA CGGCATTGCTCAGTA CTGCTGTAGAATGGG GATAAAAACATCAGA GGGCACACCAG</p>	159	427	<p>Forward: agggacaaagtgagcacagaa Reverse: cacaatgtgatgcttgcattt</p>
--	----	--	-----	-----	---

Tabla 2: Selección de primers para los transcritos objeto de estudio A: longitud de la secuencia exónica B: longitud total del producto de PCR.

4 Análisis de resultados de secuenciación

Para el análisis utilizamos el software MEGA 5.0, que está disponible de forma gratuita (<http://www.megasoftware.net>).

En nuestro caso, el programa lo utilizamos para el alineamiento de secuencias frente a una secuencia de referencia. Las secuencias que utilizamos son de ADN, la comparación de secuencias nos permite alinear nuestras dos reacciones tanto de la cadena “forward” como la “reverse” frente a la secuencia control de referencia.

El objetivo final de la comparación es localizar el alineamiento y a partir de ahí localizar variaciones o mutaciones con respecto a nuestra secuencia de referencia. Este software presenta un navegador integrado, que nos permite descargar secuencias de bases de datos en línea, de la alineación actual, sin necesidad de cortar y pegar secuencias y cambiar de formatos.

Para esto necesitamos la secuencia molde, que es la que obtenemos a través de “Ensemble Genomic Browser”. Esta se introduce en el programa junto con las secuencias de ADN de los pacientes estudiados. Utilizando la función *reverse complement*, colocamos todas las fibras (dos por cada paciente) alineadas en el mismo sentido. Para alinear todas las secuencias utilizamos el algoritmo “Clusters W”. Una vez realizado esto basta una simple mirada para detectar posibles cambios en el genoma.

3.3.2 MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

1. Obtención de muestras.

Las muestras de sangre que utilizamos normalmente para la extracción de ADN, vienen en anticoagulante EDTA. Son cedidas por los Hospitales de Extremadura pertenecientes al SES, procedentes del Servicio de Neurología del Hospital Virgen del Puerto de Plasencia, Complejo Hospitalario San Pedro de Alcántara de Cáceres, y Complejo Hospitalario Infanta Cristina de Badajoz. Se realizó el estudio sobre siete muestras de enfermos de Parkinson y dos controles sanos. Todos los pacientes y controles recibieron evaluación clínica por parte de neurólogos con amplia experiencia en el diagnóstico de la EP. Para cada paciente se completó una historia clínica que incluía su historial familiar y su examen neurológico, además de otras pruebas complementarias en su caso. La EP se diagnosticó en todos los casos de acuerdo a criterios diagnósticos habituales (L.B. Jorde, M.J.B. et al. 2011).

Todos los envíos de las muestras han de contener:

3. Muestra biológica para análisis genéticos, 3 ml de sangre recién extraída, anticoagulada con EDTA (tubos con tapón violeta) a temperatura ambiente (RT) o 4 °C por mensajero urgente.
4. Consentimiento informado. (ANEXO I)
5. Formulario de la muestra.
6. Historia Clínica del Paciente (resumida y anonimizada).

2. Purificación de ADN, Kit “ArchivePure DNA purification Manual”.

Este kit “ArchivePure DNA blood” utilizado, lo comercializa 5'PRIME. Lo utilizamos normalmente cuando queremos obtener ADN muy concentrado. La purificación del ADN, se realiza a partir de 3 ml de sangre EDTA, total de la sangre del paciente.

A. Lisis celular:

Se añaden 3 ml de sangre EDTA a un tubo de centrifuga de 15 ml que contiene 9 ml de la solución de lisis RBC. Invertimos el tubo varias veces e incubamos 5 minutos (min) a RT. Durante la incubación se invierte el tubo varias veces.

Centrifugamos a 2000xg durante dos min, en el precipitado nos quedarán las células blancas. Verter el sobrenadante y desecharlo, quedándonos con el precipitado

y aproximadamente 200 µl de sobrenadante. Agitamos vigorosamente ese precipitado con ese líquido residual, este paso facilita la lisis de las células. Añadimos 3 ml de tampón de lisis celular y agitamos de nuevo fuerte durante 10 segundos (s). Las células son estables en este tampón hasta 2 años.

B. Precipitación de las proteínas:

Incubar la muestra 3 min en hielo.

Añadimos 1 ml de solución de precipitación de proteína al lisado celular. Agitamos vigorosamente durante 20 s, hasta que quede una mezcla homogénea. Centrifugar a 2000xg durante 5 min. Una vez centrifugado deberíamos obtener un precipitado de color marrón y el sobrenadante de color claro o blanco.

C. Precipitación del ADN:

Trasvasar el sobrenadante que contiene el ADN a un tubo de centrifuga de 15 ml que contiene 3 ml de 2-propanol al 100%. Invertir el tubo hasta ver unos hilos de ADN. Centrifugar a 2000xg 3 min. Tras la centrifugación veremos un precipitado limpio y blanco. Retiramos el sobrenadante. Añadimos al precipitado 1ml de etanol al 70%. Invertir el tubo con el fin de lavar el precipitado. Volvemos a centrifugar 2000xg durante 1 min. Cuidadosamente retiramos el etanol ya que el precipitado podría perderse.

D. Hidratación del ADN:

Rehidratamos el ADN añadiendo 250 µl de una solución de hidratación al precipitado obtenido. Puede incubarse 1 h (hora) a 37 °C o dejarlo toda la noche a RT.

Centrifugamos la muestra y la pasamos a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. La muestra podrá ser almacenada a 4 °C durante periodos cortos o a -20 °C/-80 °C por un periodo más prolongado.

3. Cuantificación de la muestra purificada.

Una vez obtenido el ADN a partir de la muestra de sangre anticoagulada con EDTA o una vez realizada la purificación del producto de PCR procedemos a cuantificar la muestra y verificar la calidad y cantidad del ADN obtenido.

La cuantificación de las muestras se realiza en el espectrofotometro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), que valora el estado y pureza de la muestra tras la medida

de su absorbancia a 260 y 280 nm. El valor del cociente de absorbancia 260/280 nos permite evaluar la pureza de la muestra, si el cociente es de 1,8 en el caso del ADN, es considerado como puro, en el caso de ARN sería en torno a 2,0, si es menor a estos valores, se considera que está contaminado por ADN, fenoles, proteínas. Un valor secundario que nos da información de la pureza es, el cociente de absorbancia 260/230. Normalmente está entre 1,8 y 2,2, este dato nos indica la pureza de los ácidos nucleicos, si el valor es inferior nos indica la presencia de contaminantes.

4. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las técnicas básicas de Biología Molecular, ampliamente utilizada, debido a su rapidez, especificidad, flexibilidad y aplicabilidad, que ha revolucionado el modo de manipular, clonar y detectar fragmentos de ADN. Entre sus aplicaciones generales encontramos la generación de sondas, clonación, secuenciación, diagnóstico clínico y tipificación de individuos y microorganismos.

Una tarde de abril de 1983, Kary Mullis, tras la combinación de coincidencias, ingenuidad, suerte y errores, descubrió la técnica de PCR, un proceso que nos permite amplificar un número ilimitado de genes, un fragmento de ADN, del cual queremos obtener muchas copias. A partir de una sola molécula de ADN, la PCR puede generar 10.000 millones de moléculas similares en unas horas. La reacción es fácil de ejecutar: no requiere más que un tubo de ensayo, con unos reactivos simples y fuente de calor. El componente principal de la PCR es la ADN polimerasa. La descripción de la PCR se realizó por primera vez en una publicación en Science en 1985, sobre la detección de la mutación que causa la anemia falciforme en el ADN genómico. Los detalles del método de PCR y sus usos fueron cubiertos con más detalle en los artículos publicados en los dos años siguientes.

La ADN polimerasa utilizada originalmente para la PCR fue extraído de la bacteria *E. coli*, pero resultaba ineficaz ya que la polimerasa queda inactivada irreversiblemente, en cada ciclo de síntesis de ADN, ya que la reacción debe ser calentada para desnaturalizar el producto de ADN de doble cadena. Pero esto se solucionó con el descubrimiento de otra ADN polimerasa que soporta altas temperaturas, esta ADN polimerasa es la Taq, aislada de la bacteria *Thermus Aquaticus* (bacteria que sobrevivía a altas temperaturas en geiseres en el parque de Yellowstone, EEUU), fue la primera enzima termoestable utilizada y es la herramienta

más importante comercializada para la Biología Molecular, y con la que trabajamos en el laboratorio (Terpe 2013).

Las etapas de PCR son tres:

◆ Primera etapa: Desnaturalización del ADN, separándose las dos cadenas del ADN por rotura de los puentes de hidrógeno, necesario para la actividad llevada a cabo por la DNA polimerasa. Esto se lleva a cabo a 95 °C. Este calentamiento inicial desnatura el ADN. Dura de 90 s a 5 min.

◆ Segunda etapa: Alineamiento de los cebadores a la cadena molde complementaria sirve de lugar de ensamblaje para la síntesis por la polimerasa termoestable. Una temperatura óptima de alineamiento es 5 °C inferior a la T_m de los oligonucleótidos. Suele realizarse a 40 °C ó 60 °C. Esta temperatura llamada de “melting” o “annealing” es la temperatura a la cual los primers hibridan con la cadena molde, y es uno de los puntos críticos para que la PCR se lleve a cabo (**Tabla 3**).

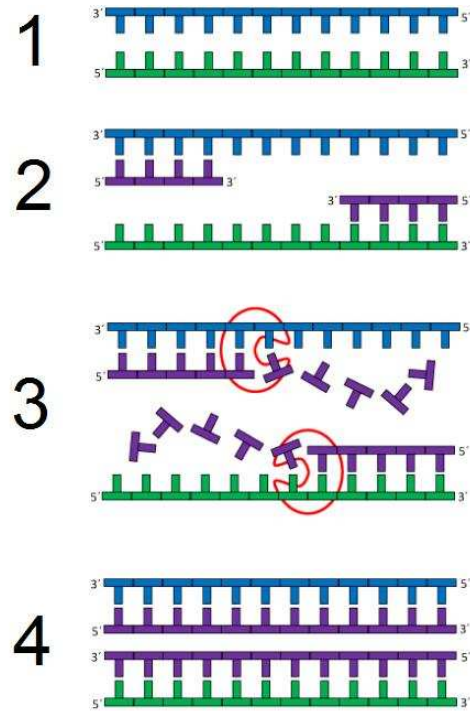


Figura 5: Simulación de las etapas de la PCR

◆ Tercera etapa: Elongación, en la cual la polimerasa lleva a cabo su acción insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde. La síntesis de ADN se inicia cuando la temperatura de la reacción llega al valor óptimo para la actividad de la polimerasa. Para la mayoría de las polimerasas esta temperatura se encuentra aproximadamente a los 72 °C. Luego se permite la síntesis durante 30 s a 2 min. Este paso completa un ciclo (**Figura 5**) y el siguiente ciclo se inicia con el retorno a los 94-95 °C para la desnaturalización.

La primera ronda de síntesis resulta en la generación de cadenas de ADN nuevas sin una longitud determinada, las cuales como las cadenas parentales, se pueden hibridar a los primers, luego se da de nuevo la desnaturalización e hibridación. Estos productos se acumulan con una progresión aritmética a través de los ciclos siguientes.

Sin embargo, en el segundo ciclo de desnaturalización, hibridación y síntesis, se produce dos productos de cadena simple que componen en conjunto un producto de doble cadena en el cual posee la longitud exacta del fragmento original delimitado entre los primers. Cada cadena de este producto discreto es complementaria a uno de los dos primers incluidos en la reacción y puede en consecuencia participar como molde en los ciclos subsiguientes.

La cantidad de este producto se duplica con cada ciclo subsiguiente, acumulándose exponencialmente. Así, treinta ciclos de desnaturalización, hibridación y síntesis resultan teóricamente en un factor de amplificación de 236 veces (68 billones de copias) del producto molecular original.

La cantidad de producto amplificado resultante va a depender de la disponibilidad de sustrato para la reacción, por eso, los oligonucleótidos y los desoxirribonucleótidos trifosforilados se añaden en exceso respecto al ADN a amplificar. La concentración de ADN, oligonucleótidos, y ADN polimerasa activa disminuyen después de cada ciclo debido a la síntesis que se está produciendo cuando la reacción llega a un máximo de amplificación, donde el rendimiento y el número de copias obtenidas no aumentan. A esto se lo conoce como el efecto "Platteau".

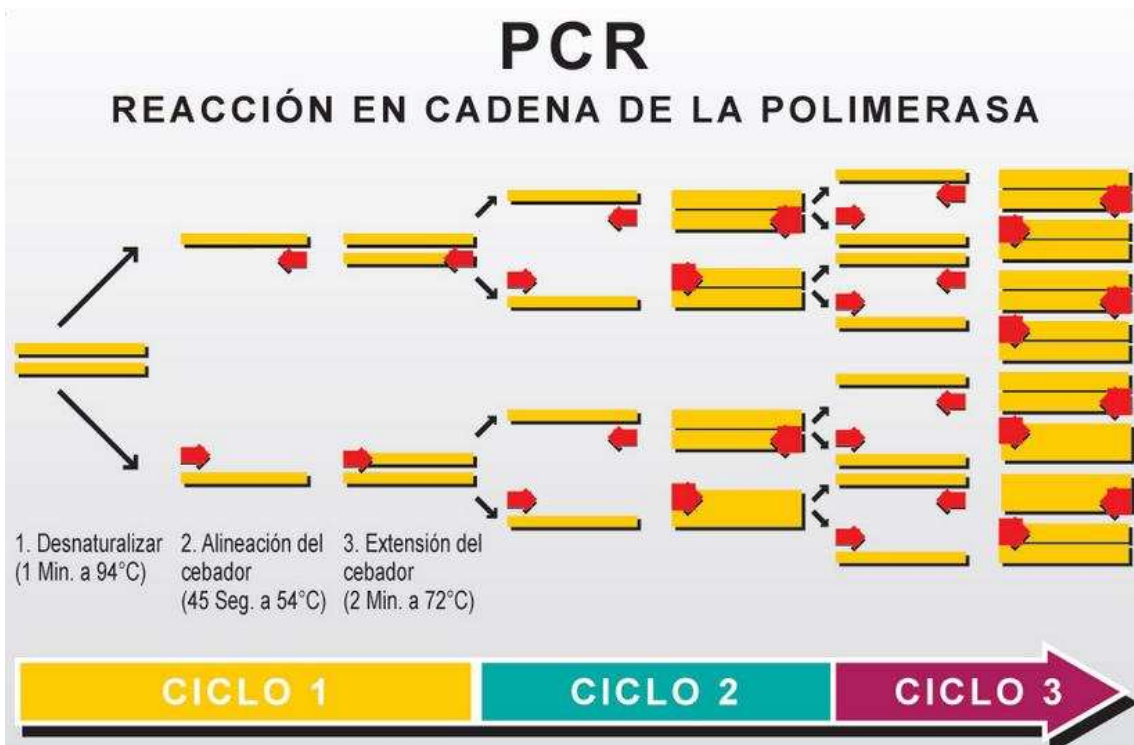


Figura 6 Amplificación de fragmentos de ADN por PCR

<i>Gen/exón</i>	<i>T_m</i>
<i>PARK 1 Exón 1</i>	<i>57,8</i>
<i>PARK 1 Exón 2</i>	<i>57,8</i>
<i>PARK 2 Exón 2</i>	<i>57,6</i>
<i>PARK 2 Exón 4</i>	<i>53,5</i>
<i>PARK 2 Exón 5</i>	<i>57,6</i>
<i>PARK 2 Exón 6</i>	<i>52,2</i>
<i>PARK 2 Exón 7</i>	<i>60,4</i>
<i>PARK 2 Exón 8</i>	<i>58,5</i>
<i>PARK 6 Exón 2</i>	<i>58</i>
<i>PARK 6 Exón 4</i>	<i>57,6</i>
<i>PARK 6 Exón.5</i>	<i>58</i>
<i>PARK 6 Exón.6</i>	<i>57,9</i>
<i>PARK 8 Exón 35</i>	<i>58,8</i>
<i>PARK 8 Exón 45</i>	<i>58,5</i>

Tabla 3: T_m óptima para cada exón analizado.

5. Reacción en Cadena de la polimerasa en tiempo real, o PCR cuantitativa (qPCR, RT-PCR)

Es una variante de la PCR convencional. Con esta técnica podemos amplificar y cuantificar de manera simultánea el ADN del producto. La diferencia con la PCR convencional radica que los cebadores están marcados con un fluoróforo. La máquina con la que realizamos la amplificación cuenta con un equipo de sensores que miden la cantidad de fluorescencia después de cada ciclo.

Nos permite distinguir si la mutación aparece, y si lo hace en su forma homocigótica o heterocigótica.

Reacción para qPCR por muestra	
2x Master Mix	10µl
40x sonda HO-1	0,5µl
H2O	8'5µl
DNA	1µl

Tabla 4: Reacción para qPCR

6. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

El análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) se utiliza para reconocer mutaciones puntuales de una secuencia génica. La presencia de mutación provoca una alteración en el número de cortes de una enzima respecto al control que en última instancia origina una variación en la longitud de los fragmentos que serán posteriormente detectados por electroforesis en gel de agarosa.

Una enzima de restricción es aquella capaz de reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortar el ADN en ese punto concreto, llamado sitio o diana de restricción. En nuestro caso las dianas de restricción son las de las mutaciones N370S y L444P del gen PARK16 (GBA).

En primer lugar realizamos una PCR (**Tabla 5**) para cada una de las dos mutaciones. Una vez obtenido el producto de amplificación lo sometemos a la acción de la enzima.

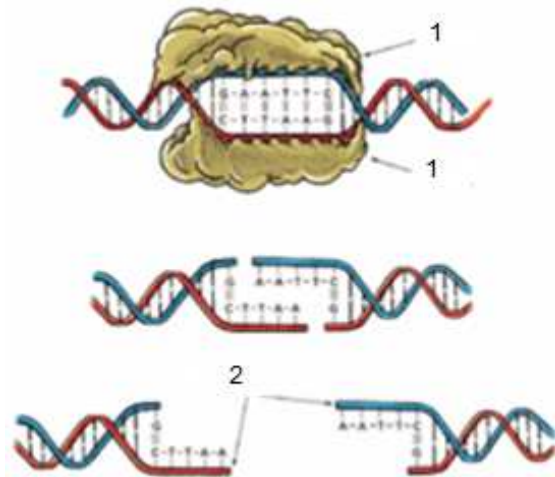


Figura7: Acción de una enzima de restricción, 1: unión al sustrato 2: corte de la molécula

Reactivos	Vol. Por muestra
Master Mix	12,5µl
H2O	9µl
Primer Fw/Rv	0,5/0,5µl
ADN	2,5µl

Tabla 5: Reacción de PCR para la amplificación del fragmento de GBA necesario para la restricción con XhoI (N370S) y NciI (L444P)

Reactivos	Vol. por muestra	Termociclador	
H2O	17 µl	1er ciclo	2º ciclo
10x fast Digest buffer	2 µl	5 min	5 min
Fast digest XhoI	1 µl	37°C	80°C
PCR product	10 µl		

Tabla 6: Restricción enzimática para GBA N370S

Reactivos	Vol por muestra	Termociclador	
H2O	17 µl	1er ciclo	2º ciclo
10x fast Digest buffer	2 µl	5 min	20min
Fast digest NciI	1 µl	37°C	80°C
PCR product	10 µl		

Tabla7: Restricción enzimática para GBA L444P

Por último realizamos una electroforesis en gel de agarosa al producto obtenido. En la tabla 7 se detallan los diferentes resultados que podemos encontrar. Si el paciente analizado es portador homocigótico de alguna de las mutaciones, observaremos dos bandas tras la electroforesis. Si por el contrario sólo observamos una banda, significa que en ADN analizado no presenta la mutación.

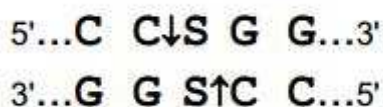


Figura 8: Punto de corte de XhoI

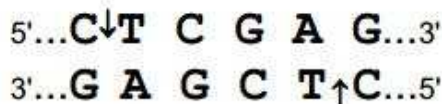


Figura 9: Punto de corte de NciI

Mutación	Primers		Tm °C	Enzima de restricción	Tamaño de los fragmentos (pb)		
	Forward	Reverse			PCR	Control	Mutante
N370S	GCCTTTG	GACAAAG	56	XhoI	105	105	89, 16
	TCCTTAC	TTACGCA					
	CCTCG	CCCAA					
L444P	GGAGGAC	ACGCTGT	56	NciI	638	638	536, 102
	CCAATTG	CTTCAGC					
	GGTGCGT	CCACTTC					

Tabla 8: Primers para amplificación por PCR y enzimas de restricción

7. Electroforesis en gel de agarosa.

El gel de agarosa se comporta como un tamiz molecular que permite separar y diferenciar las distintas moléculas en función del número de nucleótidos y del estado del ácido nucleico. Las muestras de ADN se preparan diluyéndose en el tampón de carga 6x y en agua libre de nucleasas. Se prepara también un marcador, que es una mezcla de nucleótidos de peso conocido, que nos miden como una regla el peso de las muestras analizadas. El gel de agarosa normalmente se prepara al 2% de agarosa

y se añade bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/10 ml, u otro componente equivalente llamado Redsafe, para poder visualizar posteriormente, bajo la luz UV, el resultado de la electroforesis.

Se coloca el gel en la cubeta de electroforesis y cubre con tampón Tris Borato EDTA (TBE) al 5%. A continuación, se cargan las muestras (la misma cantidad de ADN en cada pocillo) y se procede a la realización de la electroforesis, dejando migrar las muestras durante 30-60 min, a 50 v ó 100 v. Una vez acabada la técnica visualizamos los resultados en el gel con ayuda de un trans-iluminador de luz UV, donde podremos observar el resultado. El TBE al 0,5%, es un tampón libre de DNAasas y RNAasas utilizado para diluir la agarosa para la realización de un gel y como tampón para la electroforesis.

Marcador		Volumen por muestra	Preparación del gel
Tampón 6x	2 µl	Tampón 6x 2µl	40 ml TBE
DNA Ladder	2µl		0,80 g agarosa
H2O:	8µl	Muestra 10µl	3µl Red safe

Tabla9: Preparación de muestras y geles para electroforesis

Protocolo de análisis de muestras por secuenciación:

1. Reacción de amplificación para cada exón analizado: La diferencia radica en la Temperatura de acción óptima de cada primer. La siguiente tabla muestra la temperatura de cada uno de ellos. Tabla 6
2. Electroforesis en gel de agarosa
3. Purificación del producto de PCR con el kit Exosap.
4. Secuenciación
5. Análisis con el software Mega 5.0

Protocolo de análisis de muestras mediante RFLP:

1. Amplificación del fragmento en el que aparece la mutación.
2. Electroforesis del producto amplificado para verificación.
3. Restricción con las enzimas pertinentes.
4. Electroforesis en gel de agarosa para visualizar resultados.

Protocolo de análisis de muestras por qPCR

Técnica de qPCR realizada por duplicado para cada muestra.

Se ha procedido al análisis de siete casos de enfermos de párkinson mediante diversos procedimientos diagnósticos (Tabla 10).

Genes analizados	Método de análisis
PARK1- 4 Exones 1 y 2	Secuenciación
PARK2 Exones 2, 4, 5, 6, 7, 8	
PARK6 Exones 2, 4, 5, 6.	
PARK8 Exones 35 y 45	
PARK16 Mutaciones N370S y L444P	RFLP
HO-1	qPCR

Tabla 10: exones y protocolos utilizados para el estudio

4

. RESULTADOS:

1. Resultados del análisis por secuenciación

Se realizó la extracción de ADN de sangre, anticoagulada en EDTA, de diez pacientes de Parkinson. Las muestras 2, 4, y 10 no se han incluido en el estudio dado que la muestra recibida resultó insuficiente. Por esto de ahora en adelante nos referiremos a los siete pacientes que forman el estudio pacientes 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9. Se realizó la amplificación de los exones 2,4,5,6,7,8 del gen de *PARK2*, exones 2,3,4,5,6,7 del gen *PINK1*, y exones 31, 35 y 41 del gen *LRRK2*, mediante PCR, seleccionando los primers diseñados para cada región y utilizando las condiciones óptimas de PCR (**Tablas 2, 3**), obteniéndose un producto específico (**Figuras 10, 12,18-20, 23, 24**). Se purificó el producto mediante EXOSAP (**Figuras 11, 13-17**), se cuantificaron los productos de PCR purificados, presentando alta concentración y calidad.

Posteriormente se secuenciaron los exones 2, 4, 5, 6, 7, 8 de *PARK2*, 2, 4, 5, 6, 7 de *PINK1*, y los exones 31 y 41 del gen *LRRK2*, utilizando las mismas parejas de primers que en la PCR. Los resultados de secuenciación obtenidos en Stab Vida se analizaron con el programa MEGA5.0. Se verificaron los resultados tres veces. Y se obtuvieron variaciones en los genes *PINK1* y *PARK2*.

La organización de los resultados obtenidos se realiza en orden al protocolo diagnóstico, se ha organizado de este modo en vez de por paciente para optimizar tanto recursos como tiempo de trabajo.

Se han realizado un total de 17 experimentos de secuenciación. Todos se han ejecutado bajo el mismo protocolo, con pequeñas diferencias para el análisis de cada exón (**Tabla 3**).

Los productos de amplificación aparecen por duplicado, mientras que los de purificación no. Esto se debe a que una vez confirmado que el fragmento amplificado es el deseado se ha secuenciado una muestra por cada paciente. Al obtener un resultado idéntico al control no se ha considerado necesario repetir la determinación.

En el caso del paciente 9 tras observar por primera vez las variaciones halladas se han realizado otros dos análisis para confirmar los resultados, es decir la muestra de este paciente se ha analizado por triplicado.

PARK1: SNCA

Se han analizado y secuenciado dos exones (1 y 2) para este gen, los dos con más relevancia en la EP. No se ha encontrado ninguna alteración de secuencia para este gen (**Tabla2**) en ninguno de los pacientes estudiados.

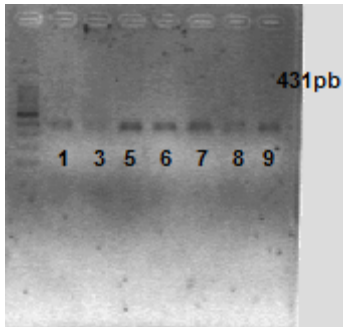


Figura 10: Purificación del producto de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7, 8 y 9 para SNCA exón 1.

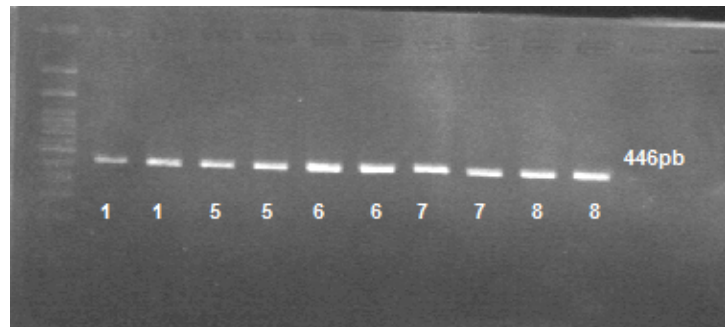


Figura 11: Producto de PCR de los pacientes 1, 5, 6, 7, 8 de SNCA exón 2

PARK2: PRKNA.

Se han analizado y secuenciado 6 exones para este gen. Los pacientes 1, 3, 5, 6, 7 y 8 no han presentado ninguna modificación en su ADN con respecto a la hebra molde en ninguno de los exones (**Tabla 2**).

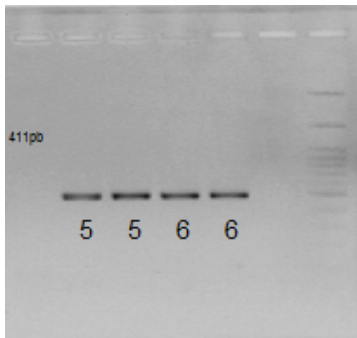


Figura 12: Producto de PCR de los pacientes 5 y 6 de PARK2 exón 2.

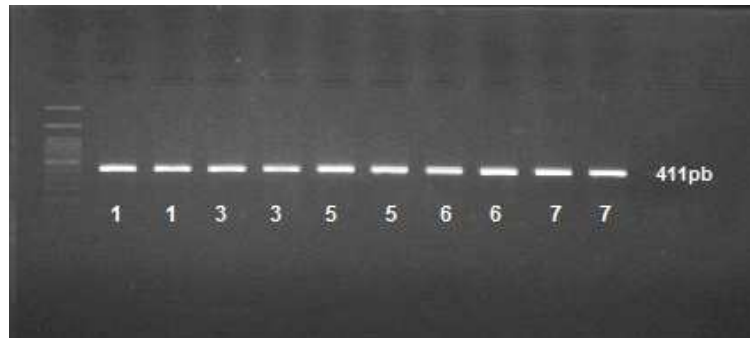


Figura 13: Producto de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6 y 7 para PARK2 exón 4.

PARK 6: PINK-1

Se han amplificado, purificado y secuenciado 6 exones para Pink-1. Los pacientes 1, 3, 5, 6, 7 y 8 no han presentado ninguna modificación en su ADN con respecto a la hebra molde. (**Tabla 2**)

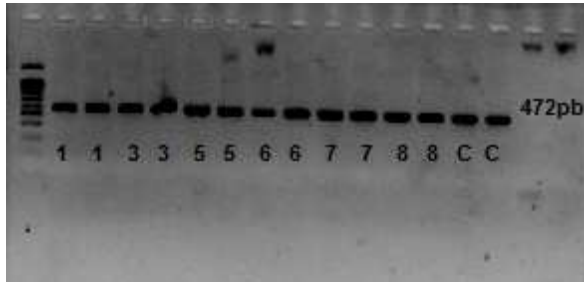


Figura 18: Producto PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7 y 8 y control para PINK1 exón 2.

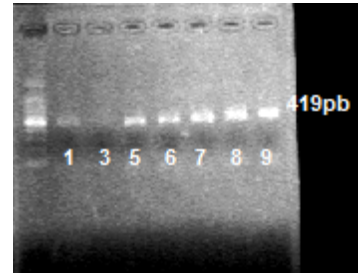


Figura 19: Purificación del producto de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7, 8 y 9 para PINK1 exón 3.

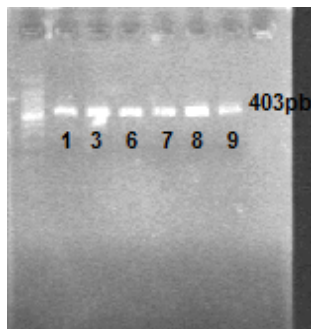


Figura 20: Purificación del producto de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7, 8, y 9 para PINK1 exón 4.



Figura 21: Producto de PCR purificado de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7 y 8 para PINK1 exón 5.

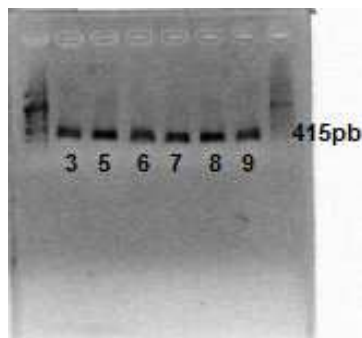


Figura 22: Producto purificado de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7 y 8 para PINK1 exón 6

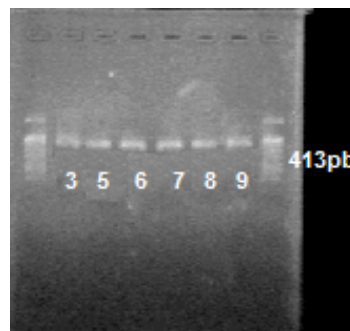


Figura 23: Producto purificado de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7, y 8 para PINK1 exón 7

En la siguiente figura se observa un fragmento de secuencia ausente en el ADN del paciente 9 con respecto al control. Este tipo de mutación se conoce como delección de un fragmento de ADN (TTTGTGTTCTAAGT). Su referencia en la base de

datos es rs55921814, esta variación origina una proteína truncada. La secuencia de referencia para el análisis del exón 5, del gen PINK1 es la siguiente (los intrones están escritos en letra minúscula y los exones en mayúsculas, en amarillo seleccionada la zona deletcionada):

gtaggagaattgctgaacctggaagggtggagggtgcagtgagccaagatcgtgctactgcactccagctgg
 cgacagagtgagactccatctcaaaaaaaaaaaaaaaaaacgtattgggagtcgtgatgtgtgtagccagaggccctc
 tcccctctccgccagCTATCCCTGTACCCTGCGCCAGTACCTTTGTGTGAACACACCCAG
 CCCCCGCCTCGCCGCCATGATGCTGCTGCAGCTGCTGGAAGGCTGGACCATCTG
 GTTCAACAGGGCATCGCGCACAGAGACCTGAAATCCGACAACATCCTTGTGGAGC
 TGGACCCAGgtaggaacctgctgcacatcagagctctccaggggcactagagggtgggtcggagcatttagga
 ctgactctcaggctcctctctggttcttcttaagtcatgtctttatttagctccgcacacaagaggttagcaatctctcccttag
 aacgggggttttttctctcttgc



Figura 24: Análisis alineamiento zona intrónica 7-8, exón 5, gen PINK1

Podemos decir por tanto que el paciente 9 presenta una delección intrónica 5-6 en PINK1 (**Figura 24**) que abarcan los primers diseñados para el exón 5. Se realizó el análisis con el programa MEGA 5.0, comparando las secuencias del paciente con la secuencia de referencia para el exón 5.

GEN	LOCALIZACIÓN	VARIACIÓN	REFERENCIA
PINK1	INTRÓN 5,6	Del: TTTGTGTTCTAAGT	rs55921814
PARK2	INTRÓN 7,8	IVS7-35G>A	rs3765474
	INTRÓN 7,8	IVS7-68C>G	rs3765475

Tabla 11: Variaciones detectadas en uno de los casos

PARK8: LRRK2

Se han amplificado y secuenciado dos exones (31 y 41) para LRRK2. Ninguno de los pacientes ha presentado modificación alguna con respecto al transcrito correspondiente (**Tabla 2**).

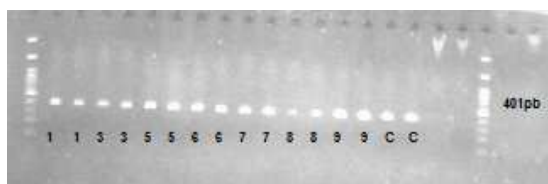


Figura 25: Producto de PCR de los pacientes 1,3, 5, 6, 7, 8, 9, y control para LRRK2 exón 31

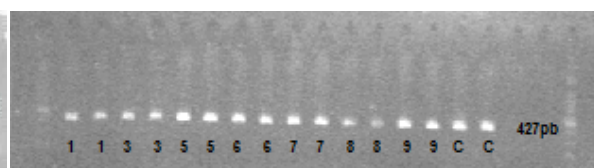


Figura 26: Producto de PCR de los pacientes 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, y control para LRRK2 exón 41

2. Resultados de RFLP:

Una vez obtenida la muestra, y purificado el ADN se amplificaron dos fragmentos del gen PARK16, los correspondientes a las mutaciones N370S y L444P. Estos fragmentos se analizaron por RFPL.

En la figura se muestra un ejemplo de los dos fragmentos para un control sano. Las dos primeras calles (A) se corresponden con el fragmento L444p de mayor peso, las dos últimas calles (B) contienen el producto amplificado de N370S.

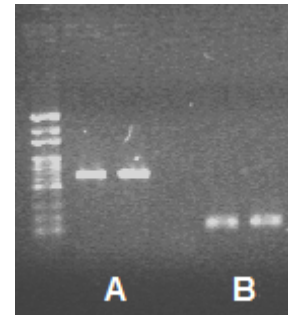


Figura27: Productos de PCR L444P y N370S

Tras amplificar el fragmento seleccionado y someterlo a RFLP obtuvimos los resultados que se muestran en las figuras 28 y 29. Ninguno de los pacientes es portador de estas mutaciones.

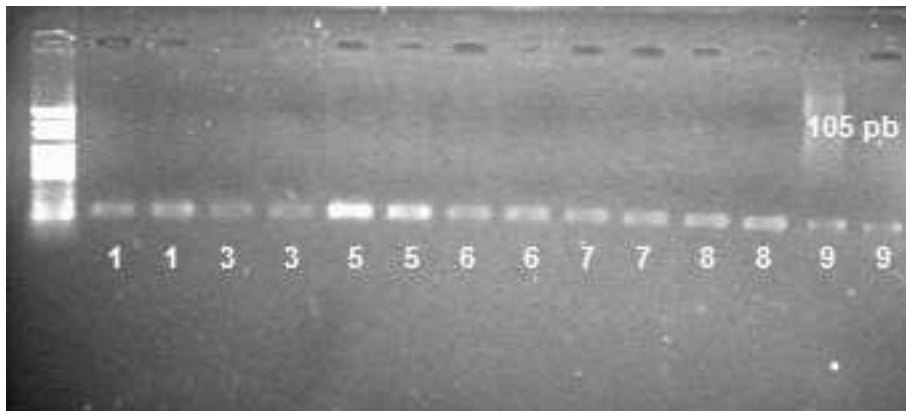
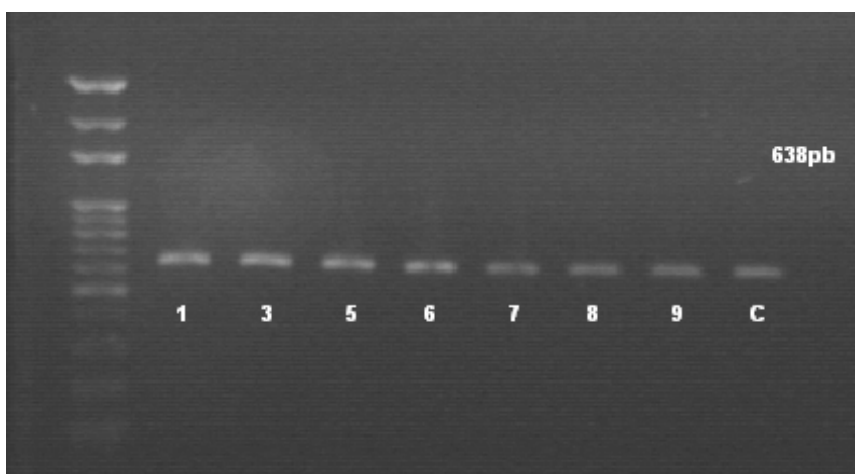


Figura28: Electroforesis del producto de RFLP por duplicado para N370S de todos los pacientes 1-9.



Todas las calles muestran una sola banda, por lo que podemos decir que ninguno de nuestros pacientes es portador.

Figura 29: Electroforesis del producto de la restricción para L444P de los pacientes 1-9 y de una muestra control.

Se expone a modo ilustrativo el resultado de restricción con XhoI del ADN de un paciente con la mutación N370S. La muestra del paciente analizada por triplicado, calles: 1, 4, 7, frente dos muestras control negativas situadas en las calles 2-3 y 5-6. El marcador utilizado es de 50pb. La muestra utilizada procede de un paciente del Hospital La Santa Cruz y San Pablo, Barcelona.



Figura 30: RFPL de una muestra con mutación en GBA N370S (1, 4, 7) frente a una muestra control (2, 3, 5, 6)

3. Resultados de qPCR para el análisis de HO-1

A partir de ADN purificado de sangre de los sujetos de estudio se realizó la detección de mutaciones en el gen HO-1. Se utilizaron sondas taqman marcadas para el alelo T. En la figura aparece un eje cartesiano con una serie de puntos de colores. Los puntos de color azul claro localizados en las diferentes regiones se corresponden con tres muestras control. El código de la variación que estamos buscando es rs2071746. Si utilizamos como referencia la cadena forward de cada uno de los dos alelos del genoma, rs2071746 nos indica un punto concreto de la cadena. En este punto podemos encontrar tres genotipos:

AA (adenina-adenina), AT (adenina-tiamina) y TT (tiamina-tiamina) éste último es el de mayor relevancia ya que parece ser que el mecanismo protector de HO-1 frente a situaciones de estrés oxidativo está abolido para este genotipo. Esto en combinación con otras mutaciones, o con la exposición a tóxicos deriva en una mayor susceptibilidad.

El genotipo AA podría conferir protección frente a procesos de apoptosis por estrés celular,

En la imagen podemos observar tres agrupaciones de puntos. La primera de ellas, a la izquierda de la imagen en color azul oscuro, representa al paciente 3, éste paciente es el único que muestra el genotipo TT.

En la zona central hay una región de puntos de color verde, estos representan a los pacientes heterocigóticos AT. Estos pacientes son 1, 7, 8 y 9.

Por último en la zona inferior (puntos de color rojo) encontraríamos a los homocigóticos AA.

En las tres regiones aparecen puntos de color azul claro, estas se corresponden con tres controles utilizados en la verificación de los datos.

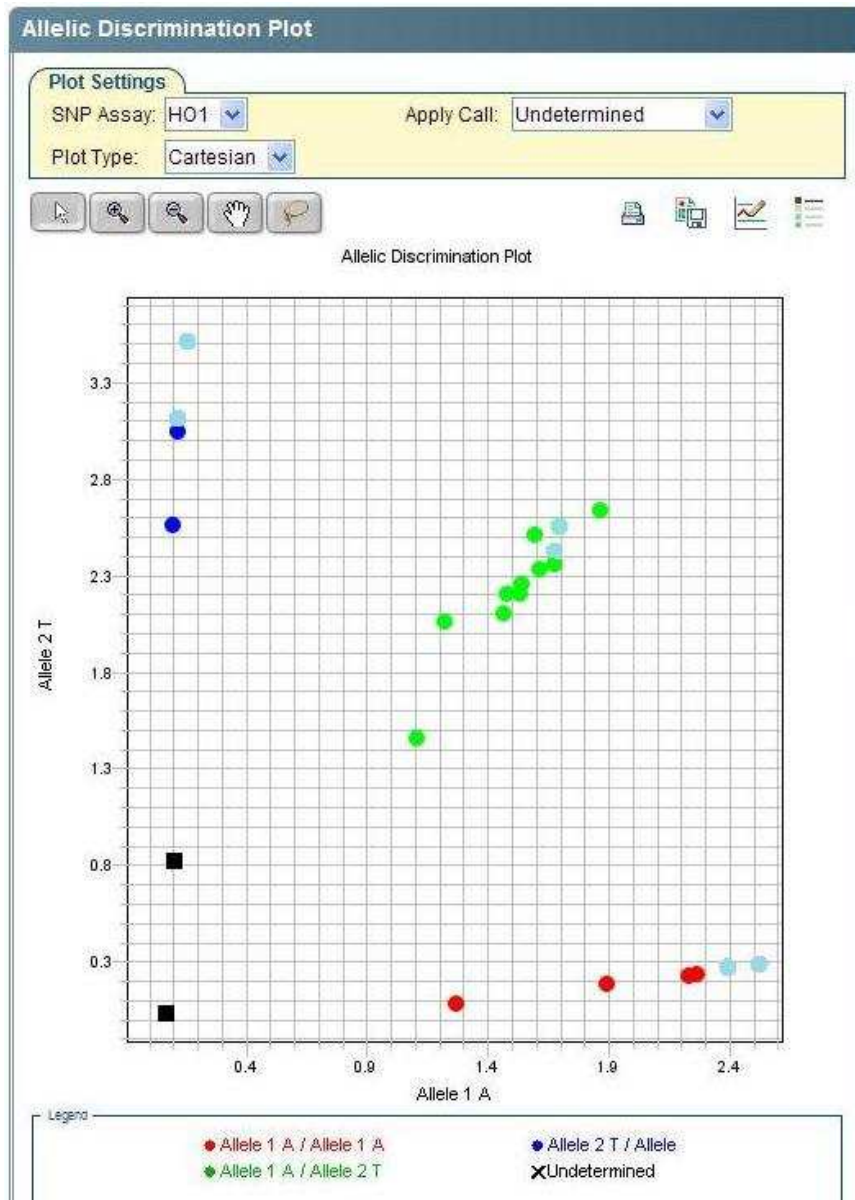


Figura 31: Resultados de qPCR de los pacientes 1 al 9. La región de puntos de color azul oscuro representa la muestra del paciente 3 (genotipo TT), En la zona central aparecen marcados en color verde los resultados de los pacientes 1, 7, 8, 9, (genotipo AT). Por último los resultados de los pacientes 6 y 7 aparecen en color rojo (genotipo AA). Los cuadrados de color negro son controles negativos sin ADN.

5

Discusión.

Este trabajo ha consistido en la puesta a punto de las técnicas de biología molecular precisas para la detección de varios polimorfismos y mutaciones en seis genes asociados a EP, y su aplicación en el diagnóstico de una población de siete enfermos de Extremadura.

Para ello hemos revisado la transcripción de los genes estudiados, y a partir de ahí seleccionado los fragmentos que se consideraron de mayor interés, que han sido secuencias exónicas codificantes. Por el momento el interés se centra en estas zonas ya que no se conoce con exactitud la función de los segmentos intrónicos situados entre ellas.

Una vez que se ha obtenido el resultado de los análisis, los hemos comparado con muestras de control, intentando identificar variaciones patológicas o polimorfismos.

Para la obtención de unos resultados fiables es imprescindible que la técnica de PCR o qPCR se realice en las condiciones óptimas para el primer utilizado. Es fundamental la ejecución de la técnica de manera meticulosa ya que una manipulación ineficaz de los reactivos utilizados podría significar la contaminación de los mismos, lo que nos llevaría a errores en el resultado.

El diseño correcto de los primers es una labor compleja en la que se deben revisar todos los factores que pueden influir en su funcionamiento. Debemos asegurarnos que la secuencia del primer es específica para la zona que queremos estudiar, si no lo hiciésemos podrían amplificar zonas diferentes del genoma. Es muy importante también confirmar que la hibridación de los primers diseñados es eficaz, ya que uno de los errores que se pueden dar en el diseño es que hibriden entre ellos, por tanto no se unirían a su diana y no obtendríamos el producto deseado.

Hallar un diagnóstico genético para la EP es una labor tremendamente compleja, ya que su origen es multifactorial, y no podemos saber con exactitud en qué medida el paciente ha estado expuesto o no a sustancias desencadenantes. Entra también en juego la posibilidad de que este presente una mutación no conocida o no contemplada en el estudio.

En el análisis genético de siete pacientes con enfermedad de Parkinson hemos hallado tres variaciones polimórficas. La de mayor relevancia es la delección en el intrón 5-6 del gen *PINK1* (rs55921814) del fragmento “tcctctctggttggttctaagt”, esta origina una proteína truncada. En el gen *PARK2* se encontró un cambio de G>A

(rs3765474) y un cambio C>G (rs3765475). Estas variaciones no están descritas con significado clínico patológico pero nos hace pensar que el sumatorio de estos polimorfismos podría hacer susceptible de enfermedad a este paciente. Puede significar que, algún otro gen o genes no incluidos en el estudio, esté implicado en la enfermedad. Estas variaciones en *Parkina* están descritas, como polimorfismos y hay estudios de estos polimorfismos y su asociación a mutaciones en genes de Parkinson. Aunque no hay nada concluyente. Las zonas exónicas también se compararon con análisis de controles sanos, pudiéndose apreciar en los resultados las diferencias de forma más clara.

Bibliografía

- Abbas, N., C. B. Lucking, et al. (1999). "A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease." Hum Mol Genet **8**(4): 567-574.
- Bardien, S., S. Lesage, et al. (2011). "Genetic characteristics of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) associated Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **17**(7): 501-508.
- Di Fonzo, A., C. F. Rohe, et al. (2005). "A frequent LRRK2 gene mutation associated with autosomal dominant Parkinson's disease." Lancet **365**(9457): 412-415.
- Dinis-Olivera, R. j., F. Remiao, et al (2006). "P-glycoprotein induction:induction antidotal pathway for paraquat-induced lung toxicity."
- Farrer, M. J. (2006). "Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects." Nat Rev Genet **7**(4): 306-318.
- Funayama, M., K. Hasegawa, et al. (2002). "A new locus for Parkinson's disease (PARK8) maps to chromosome 12p11.2-q13.1." Ann Neurol **51**(3): 296-301.
- Gaig, C., M. Ezquerra, et al. (2006). "LRRK2 mutations in Spanish patients with Parkinson disease: frequency, clinical features, and incomplete penetrance." Arch Neurol **63**(3): 377-382.
- Gan-Or, Z., N. Giladi, et al. (2008). "Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset." Neurology **70**(24): 2277-2283.
- Gandhi, S., M. M. Muqit, et al. (2006). "PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease." Brain **129**(Pt 7): 1720-1731.
- Garcia-Ramos, R., E. Lopez Valdes, et al. (2013). "The social impact of Parkinson's disease in Spain: Report by the Spanish Foundation for the Brain." Neurologia.
- Gilks, W. P., P. M. Abou-Sleiman, et al. (2005). "A common LRRK2 mutation in idiopathic Parkinson's disease." Lancet **365**(9457): 415-416.
- Goker-Alpan, O., R. Schiffmann, et al. (2004). "Parkinsonism among Gaucher disease carriers." J Med Genet **41**(12): 937-940.
- Gonzalez-Polo, R. A., M. Niso-Santano, et al. (2007). "Relationship between autophagy and apoptotic cell death in human neuroblastoma cells treated with paraquat: could autophagy be a "brake" in paraquat-induced apoptotic death?" Autophagy **3**(4): 366-367.
- Health, N. I. o. (2013). "www.omim.org."
- Health, N. L. o. M. N. I. o., Ed. (2013). Genetics Home Reference Handbook.
- Ibanez, P., A. M. Bonnet, et al. (2004). "Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease." Lancet **364**(9440): 1169-1171.

- Infante, J., E. Rodriguez, et al. (2006). "LRRK2 G2019S is a common mutation in Spanish patients with late-onset Parkinson's disease." Neurosci Lett **395**(3): 224-226.
- Infante, J., M. Sierra, et al. (2011). "Interaction between heme oxygenase-1 genotypes and exposure to pesticides in Parkinson's disease." Mov Disord **26**(5): 916-917.
- Jarvi, K. and D. Chitayat (2008). "The genetics you never knew: a genetics primer." Urol Clin North Am **35**(2): 243-256, ix.
- Kachergus, J., I. F. Mata, et al. (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**(4): 672-680.
- Kitada, T., S. Asakawa, et al. (1998). "Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism." Nature **392**(6676): 605-608.
- Klein, C., P. P. Pramstaller, et al. (2000). "Parkin deletions in a family with adult-onset, tremor-dominant parkinsonism: expanding the phenotype." Ann Neurol **48**(1): 65-71.
- L.B. Jorde, M.J.B., et al. (2011). Genética Médica, 4ª Edición.
- Lang, A. E. and A. M. Lozano (1998). "Parkinson's disease. First of two parts." N Engl J Med **339**(15): 1044-1053.
- Lesage, S., A. Durr, et al. (2006). "LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs." N Engl J Med **354**(4): 422-423.
- Li, Y., H. Tomiyama, et al. (2005). "Clinicogenetic study of PINK1 mutations in autosomal recessive early-onset parkinsonism." Neurology **64**(11): 1955-1957.
- Lucking, C. B., A. Durr, et al. (2000). "Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene." N Engl J Med **342**(21): 1560-1567.
- Maraganore, D. M., M. de Andrade, et al. (2006). "Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease." JAMA **296**(6): 661-670.
- Mata, I. F., O. A. Ross, et al. (2006). "LRRK2 mutations are a common cause of Parkinson's disease in Spain." Eur J Neurol **13**(4): 391-394.
- Miller, D. W., S. M. Hague, et al. (2004). "Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication." Neurology **62**(10): 1835-1838.
- Nichols, W. C., N. Pankratz, et al. (2005). "Genetic screening for a single common LRRK2 mutation in familial Parkinson's disease." Lancet **365**(9457): 410-412.
- Nishioka, K., O. A. Ross, et al. (2009). "Expanding the clinical phenotype of SNCA duplication carriers." Mov Disord **24**(12): 1811-1819.

- Niso-Santano, M., J. M. Moran, et al. (2006). "Low concentrations of paraquat induces early activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2, protein kinase B, and c-Jun N-terminal kinase 1/2 pathways: role of c-Jun N-terminal kinase in paraquat-induced cell death." Toxicol Sci **92**(2): 507-515.
- Paisan-Ruiz, C. (2009). "LRRK2 gene variation and its contribution to Parkinson disease." Hum Mutat **30**(8): 1153-1160.
- Paisan-Ruiz, C., S. Jain, et al. (2004). "Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease." Neuron **44**(4): 595-600.
- Polymeropoulos, M. H., C. Lavedan, et al. (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science **276**(5321): 2045-2047.
- Scapagnini, G., V. D'Agata, et al. (2002). "Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain." Brain Res **954**(1): 51-59.
- Schipper, H. M. (2004). "Heme oxygenase-1: transducer of pathological brain iron sequestration under oxidative stress." Ann N Y Acad Sci **1012**: 84-93.
- Sidransky, E., M. A. Nalls, et al. (2009). "Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease." N Engl J Med **361**(17): 1651-1661.
- Singleton, A. B., M. Farrer, et al. (2003). "alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease." Science **302**(5646): 841.
- Singleton, A. B., M. J. Farrer, et al. (2013). "The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications." Mov Disord **28**(1): 14-23.
- Terpe, K. (2013). "Overview of thermostable DNA polymerases for classical PCR applications: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." Appl Microbiol Biotechnol **97**(24): 10243-10254.
- van der Mark, M., P. C. Nijssen, et al. (2014). "A case-control study of the protective effect of alcohol, coffee, and cigarette consumption on Parkinson disease risk: time-since-cessation modifies the effect of tobacco smoking." PLoS One **9**(4): e95297.
- Zimprich, A., S. Biskup, et al. (2004). "Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology." Neuron **44**(4): 601-607.

