

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA Y
DETECCIÓN DE MUTACIONES EN
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE
PARKINSON. COMPARACION GENÉTICO-
CLÍNICA ENTRE LOS CASOS ESPORÁDICOS
Y FAMILIARES**

José Esteban Muñoz García

2001

Universitat de Barcelona

**ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA Y DETECCIÓN DE
MUTACIONES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE
PARKINSON. COMPARACION GENÉTICO-CLÍNICA ENTRE
LOS CASOS ESPORÁDICOS Y FAMILIARES**

José Esteban Muñoz García

Tesis realizada bajo la dirección de los **Dres. Eduardo Tolosa
Sarró y Rafael Oliva Virgili** en el Hospital Clínic i Universitari de
Barcelona

Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona

Los abajo firmantes **Dr. Eduardo Tolosa Sarró** y **Dr. Rafael Oliva Virgili**

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral **ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA Y DETECCIÓN DE MUTACIONES EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE PARKINSON. COMPARACION GENÉTICO-CLÍNICA ENTRE LOS CASOS ESPORÁDICOS Y FAMILIARES**, presentada por **José Esteban Muñoz García**, para optar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos necesarios para ser leída ante el tribunal correspondiente.

En Barcelona, a 1 de octubre de dos mil uno.

Dr. Eduardo Tolosa Sarró

Dr. Rafael Oliva Virgili

INDICE GENERAL

I. ANTECEDENTES DEL TEMA

1. Introducción general.....	8
1.1. Aspectos históricos de la enfermedad de Parkinson.....	8
1.2. Prevalencia.....	9
1.3. Clínica y diagnóstico.....	10
1.4. Anatomía patológica.....	12
1.5. Fisiopatología	13
1.6. Patogenia	15
2. Etiología de la enfermedad de Parkinson	16
2.1 Factores ambientales.....	17
2.2. Factores genéticos.....	20
2.2.1. Estudios de agregación familiar.....	21
2.2.1.1. Estudios de casos controles	21
2.2.1.2. Estudios clínicos en gemelos.....	22
2.2.1.3. Estudios con tomografía de emisión de positrones.....	24
2.2.2. Estudios de genética molecular	
2.2.2.1. Enzimas involucradas en el metabolismo de la dopamina y de sustancias tóxicas.....	25
2.2.2.2. α 1-antiquimotripsina.....	30
2.2.2.3. Receptor D2 de la dopamina.....	30
2.2.2.4. α -sinucleína.....	31

2.2.2.5. Gen parkin.....	36
2.2.2.6. Otros genes.....	39

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis de trabajo.....	42
2. Objetivos.....	43

III. MATERIAL Y MÉTODOS 45

IV. RESULTADOS

1. Trabajo 1. α_1 -antichymotrypsin gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. Neurology 1999;52:297-301.....	52
2. Trabajo 2. Dopamine receptor D2 intronic polymorphism in patients with Parkinson's disease. Neurosci Lett 1999;273:151-154.....	58
3. Trabajo 3. Identification of Spanish familial Parkinson's disease and screening for the Ala53Thr mutation of the α -synuclein gene in early onset cases. Neurosci Lett 1997;235:57-60.....	63
3. Trabajo 4. Analysis of the coding and 5' flanking regions of the α -synuclein gene in patients with Parkinson's disease. Mov Disord (en prensa).....	68
5. Trabajo 5. A new mutation in the parkin gene in a patient with atypical autosomal recessive juvenile parkinsonism. Neurosci Lett 2000;289:66-68.....	84

6. Trabajo 6. Relative high frequency on the c.255delA parkin gene mutation in Spanish patients with autosomal recessive parkinsonism.

Neurology (Sometido)..... 88

7. Trabajo 7. Enfermedad de Parkinson esporadica y familiar: estudio comparativo.

Med Clin (Barcelona) 2001;116:601-604.....106

V. DISCUSION GENERAL	112
VI. CONCLUSIONES	121
VII. BIBLIOGRAFIA.....	124
VIII. ABREVIATURAS.....	155

I. ANTECEDENTES DEL TEMA

1. INTRODUCCION GENERAL

1.1. Aspectos históricos de la enfermedad de Parkinson

Existen breves descripciones en la antigüedad de personas que presentaban trastornos del movimiento. Así, Hipócrates, Celsius y Galeno habían descrito pacientes con temblor y en papiros egipcios se había dejado constancia de la aparición de síntomas parkinsonianos en personas de edad avanzada (Patten, 1993). Sin embargo, no fue hasta la segunda década del siglo XIX, cuando un médico inglés, aficionado a la geología, la paleontología, y con inquietudes sociales, llamado **James Parkinson** (Eyles, 1955; Macrobius y Naumann, 1980), publica en 1817 un trabajo titulado “Essay on the Shaking Palsy” en el que se describen seis pacientes con una enfermedad caracterizada por temblor de extremidades en reposo, postura encorvada y marcha progresivamente acelerada. James Parkinson llamó a esta enfermedad “parálisis agitante” y creyó que su causa estaba en una alteración a nivel de la médula cervical. Jean Martin Charcot a finales del siglo XIX describe que los pacientes con “parálisis agitante” presentan además rigidez y rebautiza a la enfermedad como enfermedad de Parkinson (EP) (Patten, 1993). Charcot incluyó la EP en el grupo de las neurosis, ya que no identificó ninguna lesión en el sistema nervioso que pudiera justificarla y además había observado que los síntomas empeoraban claramente con el estrés y con las emociones. Posteriormente, ya en el siglo XX, Wilson insistió en la importancia de la disminución del movimiento en los pacientes parkinsonianos e introdujo el término de acinesia, quedando así constituida la

tríada clásica de la enfermedad; es decir, temblor, rigidez y acinesia. En la tercera década del siglo XX, Tretiakoff descubrió que la lesión básica de los pacientes parkinsonianos asentaba en el mesencéfalo y concretamente en la sustancia negra. Años más tarde, **Ehringer y Hornykewicz** (1960), descubrieron que en el núcleo caudado de los pacientes parkinsonianos había poca dopamina en comparación con los controles. Este hallazgo fue crucial en la búsqueda de tratamientos efectivos para la enfermedad. Así, a finales de los años 60, **George C. Cotzias** y cols. (1967) iniciaron la era moderna de la terapia parkinsoniana al demostrar que la levodopa, un precursor de la dopamina que se transforma en ésta cuando llega al cerebro, mejoraba espectacularmente los síntomas de los pacientes. Desde entonces, la levodopa constituyó y sigue constituyendo la base del tratamiento de la EP.

1.2. Prevalencia

La prevalencia de la enfermedad de Parkinson es variable en función de la población analizada, la edad y el sexo. En Europa y Norteamérica se da la prevalencia más alta y en Asia y África la más baja (Li y cols, 1985; Schoenberg y cols, 1988). La mayoría de estudios han demostrado una mayor prevalencia en hombres que en mujeres (Goldman y Tanner, 1998), aunque en dos estudios poblacionales europeos se ha encontrado una prevalencia similar para ambos sexos (Morgante y cols., 1992; de Rijk y cols., 1995). La enfermedad afecta a más del 1% de la población caucásica por encima de los 55 años y su prevalencia aumenta con la edad, siendo del 3.1% en sujetos entre 75 y 84 años y de 4,3% en los sujetos entre 85 y 94 años (de

Rijk y cols., 1995). Así pues, la EP constituye el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente, después de la enfermedad de Alzheimer. La incidencia anual oscila entre 4,5-21 casos por cada 100.000 habitantes. La edad media de inicio de la enfermedad está entre los 55 y los 60 años, y aunque dos tercios de los pacientes inician los síntomas entre los 50 y 70 años, no es raro el diagnóstico en la cuarta década de la vida.

1.3. Clínica y diagnóstico

A pesar de los avances realizados en el conocimiento de la enfermedad, aún hoy en día el diagnóstico de la EP es básicamente clínico. Es decir, no existe un marcador biológico que nos permita predecir o asegurar si una persona desarrollará o está ya afecto por la enfermedad. Desde el punto de vista clínico los pacientes suelen presentar temblor de predominio en reposo, lentitud de movimientos (bradicinesia), rigidez en extremidades y cuello y trastorno progresivo de la marcha. El diagnóstico clínico se refuerza con el inicio unilateral, y lo más importante, la respuesta significativa, mantenida, al tratamiento con levodopa. Diversos autores han formulado una serie de criterios diagnósticos de la EP (Gibb et al., 1988; Calne et al. 1992; Gelb et al., 1999). En la tabla 1 aparecen los criterios propuestos por la Parkinson's Disease Society Brain Bank de Londres (Hughes et al., 1992).

Tabla 1. Criterios diagnósticos de la enfermedad de Parkinson

a) Diagnóstico de un Sd. parkinsoniano

- Bradicinesia
- Al menos uno de los siguientes:
 - rigidez muscular
 - temblor en reposo
 - inestabilidad postural (no explicada por un trastorno visual, vestibular, cerebeloso o de la sensibilidad propioceptiva)

b) Criterios de exclusión

- AVCs de repetición
- Traumatismo craneales de repetición
- Historia de encefalitis o crisis oculogiras
- Tratamiento con neurolépticos al inicio de los síntomas
- Más de un familiar afecto
- Remisión sostenida o estrictamente unilateral después de 3 años.
- Oftalmoplejia supranuclear, signos cerebelosos o piramidales
- Signos disautonómicos severos
- Demencia precoz severa con alteración de la memoria, lenguaje y las praxias
- Presencia de un tumor cerebral o una hidrocefalia en TAC
- Ausencia de respuesta a l-dopa
- Exposición al MPTP

c) Criterios de apoyo de la EP (3 o más para el diagnóstico definitivo)

- Inicio unilateral
 - Presencia de temblor en reposo
 - Trastorno progresivo
 - Asimetría persistente afectando más al lado donde se inició la enfermedad.
 - Excelente respuesta a L-dopa (70-100%)
 - Corea inducida por L-dopa.
 - Respuesta a L-dopa durante más de 5 años.
 - Curso clínico de 10 años o más.
-

Los criterios de exclusión propuestos por el Brain Bank de Londres (tabla 1) pueden ser suplementados por la presencia de atrofia cerebelosa en la neuroimagen o la existencia de denervación del esfínter anal externo por EMG. Aunque la demencia precoz se considera un criterio de exclusión, hoy se sabe que con la evolución de la enfermedad un porcentaje considerable de pacientes (15-20%) acaban presentando síntomas de deterioro mental (Quinn et al 1986).

1.4. Anatomía patológica

El sustrato anatomopatológico de la enfermedad viene condicionado por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y el depósito de unas inclusiones eosinofílicas citoplasmáticas denominadas *cuerpos de Lewy* en las neuronas supervivientes. Sin embargo, el proceso no se limita a la sustancia negra y la vía nigroestriatal, y hoy en día se sabe que también el locus ceruleus (adrenérgico) y el núcleo basal de Meynert (colinérgico) degeneran. Además se han descrito depósitos de Lewy en el núcleo motor dorsal del vago, el hipotálamo, el núcleo basal de Meynert, el locus ceruleus, el núcleo de Edinger-Westphal, los núcleos del rafe, en el cortex cerebral, en el bulbo olfatorio y en los ganglios autonómicos (Forno LS, 1996). Los cuerpos de Lewy son PAS negativos, ya que no contienen carbohidratos, y adquieren una luminosidad marronosa con la tinción de plata. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha demostrado que los cuerpos de Lewy reaccionan con anticuerpos a componentes del citoesqueleto

(Hill et al., 1991) y además, están ubicuitinados (Lennox et al., 1989). En el contexto clínico adecuado y en conjunción con el resto de hallazgos necrópsicos, los cuerpos de Lewy permiten realizar el diagnóstico de certeza de la EP. Sin embargo, los cuerpos de Lewy no deben considerarse patognomónicos de la EP, ya que se han descrito en otras enfermedades neurodegenerativas (Tabla 2).

Tabla 2.- Enfermedades con formación de cuerpos de Lewy

Enfermedad de Parkinson

Enfermedad difusa por cuerpos Lewy (Kosaka y cols., 1984)

Parálisis supranuclear progresiva (Gearing y cols, 1994)

Esclerosis lateral amiotrófica familiar y esporádica (Takahashi y cols, 1972, Maruyama y cols., 1989; Sasaki y Maruyama, 1991)

Síndrome de Hallervorden-Spatz (Arawaka y cols., 1998)

1.5. Fisiopatología

Para entender la fisiopatología de la EP es importante conocer las interacciones entre la sustancia negra, los ganglios basales, los núcleos subtálamicos, el tálamo, y el córtex cerebral. El núcleo caudado y el putamen tienen una arquitectura similar. El 90-95% de las neuronas son células nerviosas espinosas gabaérgicas de tamaño medio que proyectan hacia el núcleo pálido y la sustancia negra reticulada. Las neuronas que proyectan al núcleo pálido externo contienen el neuropéptido encefalina y las que

proyectan al núcleo pálido interno y a la sustancia negra reticulata contienen sustancia P. Esto da lugar a dos vías diferentes, una se ha denominado la vía directa, que conecta el estriado con el globo pálido interno y la sustancia negra reticulada, y otra la vía indirecta, que conecta el estriado con el globo pálido externo y éste con los núcleos subtálamicos. Del globo pálido externo parten vías gabaérgicas (inhibitorias) y del subtálamo glutamatérgicas (excitatorias) que se dirigen hacia el pálido interno y la sustancia negra reticulada. Desde el pálido interno/sustancia negra saldrían proyecciones gabaérgicas hacia el tálamo y desde aquí saldrían vías glutamatérgicas hacia las áreas sensitivo-motoras y el área motora suplementaria del córtex. Finalmente el córtex enviaría proyecciones glutamatérgicas hacia la sustancia negra compacta y el estriado, cerrándose el circuito. La pérdida de dopamina en la sustancia negra induciría efectos excitatorios en determinadas neuronas e inhibitorios en otras, actuando de forma diferente en la vía directa que en la indirecta y produciendo un desequilibrio con aumento de la actividad en el eje subtálamo-globus pálido interno que parece ser determinante para la aparición de las manifestaciones motoras de la enfermedad. El conocimiento de este modelo ha permitido el desarrollo de diversas estrategias quirúrgicas en el tratamiento la enfermedad que tienen como objetivo interrumpir el circuito en un punto determinado para así revertir la disfunción del mismo (Benabid y cols., 1991; Guridi y cols., 1993; Lozano y cols., 1995; Limousin y cols., 1995; Valldeoriola y cols., 2001).

1.5. Patogenia

Diversos mecanismos patogénicos han sido implicados en la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. El descubrimiento de que un tóxico denominado *1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)* induce un daño mitocondrial y un cuadro de parkinsonismo similar al que presentan los pacientes con EP (Langston y cols., 1983) y la demostración de alteraciones del funcionalismo mitocondrial en los pacientes con EP (Schapira y cols., 1990; Cardellach et al., 1993; Shults et al., 1997), sugieren la posibilidad de que un *fallo energético mitocondrial* pueda ser el responsable de la enfermedad. Sin embargo, no está claro si la disfunción mitocondrial es un fenómeno primario o secundario en la EP (Przedborski y cols., 1993). En modelos “in vitro” se ha demostrado que el metabolismo de la dopamina a través de la MAO es capaz de generar peróxido de hidrógeno y radicales libres (Cohen y cols., 1983) que pueden ser tóxicos para la neurona. Este mecanismo de *estrés oxidativo* ha sido abordado clínicamente mediante el tratamiento con antioxidantes (vitamina E) e inhibidores de la MAO-B (selegilina), sin que se haya podido demostrar un efecto neuroprotector de estas sustancias en una larga cohorte de pacientes (Parkinson Study Group, 1996). Otros mecanismos que podrían intervenir en la muerte neuronal son la *excitotoxicidad* mediada por aminoácidos excitatorios como el glutamato y el aspartato, la toxicidad derivada de la *síntesis de óxido nítrico* (Beal, 1998) y el *déficit de factores tróficos neuronales* (Hyman y cols., 1991; Sendtner y Toyka, 1995)

2. ETIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

A pesar de los avances producidos en las últimas décadas en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos y en el tratamiento de la EP, la causa de la enfermedad es todavía desconocida en la inmensa mayoría de los casos. Se cree que factores ambientales y genéticos podrían estar involucrados en el desarrollo de la EP.

La etiología de la EP ha sido ampliamente discutida a lo largo de la historia de la enfermedad. Inicialmente James Parkinson creyó que su origen estaba en la *médula cervical* y destacó la posibilidad de que una noxa crónica a este nivel pudiera ser la causa. Posteriormente, Gowers (1888) introduce la posibilidad de que se trate de *una enfermedad hereditaria* ya que encuentra antecedentes familiares en un número considerable de pacientes. La aparición de casos de parkinsonismo postencefalítico (encefalitis epidémica de Von Economo) hizo atribuir el origen de la EP a un *agente infeccioso* (Poskander and Schwab, 1963). Sin embargo, la teoría infecciosa ha perdido apoyo tras demostrarse que la EP y el parkinsonismo postencefalítico son dos entidades clínico-patológicas diferentes y que en ningún estudio se ha podido asociar la EP con un agente infeccioso específico. Múltiples *tóxicos* ambientales se han intentado relacionar con la EP, pero, como veremos a continuación, hasta ahora ninguno de ellos ha podido ser relacionado de forma clara con la enfermedad. En la tabla 3 figuran los factores de riesgo que se han asociado con mayor frecuencia a la EP en diferentes estudios.

2.1. Factores ambientales

La aparición de cuadros de parkinsonismo secundarios a la intoxicación con *1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)* reforzó la hipótesis de la etiología tóxico-ambiental en la EP. Los primeros casos de parkinsonismo en intoxicados por MPTP fueron descritos en adictos a narcóticos por vía parenteral (Langston y cols., 1983). A excepción del rápido inicio de los síntomas, los pacientes presentaban un cuadro clínico similar al descrito en la enfermedad de Parkinson, con respuesta a levodopa y aparición de discinesias secundarias al tratamiento. El MPTP atraviesa la barrera hemato-encefálica fácilmente debido a su gran liposolubilidad y en las células gliales es oxidado y convertido, a través de la monoamino-oxidasa B, en 1-metil-4-fenil-piridinio (MPP⁺), que es la neurotoxina activa, siendo posteriormente recaptado por las neuronas nigroestriatales. El MPP⁺ se concentra en la mitocondria e inhibe al complejo I interfiriendo en la síntesis de ATP con el consiguiente fallo energético celular que conduce de forma inexorable a la muerte neuronal. También se han descrito cuadros de parkinsonismo agudo en relación a la intoxicación con *insecticidas organofosforados* (Senanayake y Sanmuganathan, 1995; Bhatt y cols., 1999), que actuarían por un mecanismo similar al MPTP; y se ha hipotetizado que determinadas toxinas endógenas, como las *isoquinolinas* o las *β-carbolinas*, podrían iniciar la degeneración nigral en sujetos genéticamente predispuestos (Nagatsu, 1997; Matsubara y cols. 1998).

Diversos estudios epidemiológicos han encontrado una asociación entre la EP y determinados factores ambientales como son el vivir en un *ambiente rural*, el contacto con aguas residuales, el consumo de *agua de pozo*, o el contacto con pesticidas entre otros. Sin embargo, no todos los estudios coinciden en los mismos factores de riesgo (Barbeau y cols., 1986; Tanner y cols., 1989; Ho y cols., 1989; Wong y cols., 1991; Seidler y cols. 1996; Semchuk y cols. 1992; Jiménez-Jiménez y cols. 1998; Goldman y Tanner, 1998; Menegon y cols. 1998; Taylor y cols. 1999).

El *consumo de tabaco* se ha asociado de forma inversa al riesgo de sufrir la EP (De Michele y cols., 1996; Morens y cols. 1995; Gorell y cols 1999). En modelos animales experimentales se ha demostrado que la nicotina protege de la pérdida de neuronas dopaminérgicas (Janson y cols., 1992; Janson y Moller, 1993; Prasad y cols., 1994). Además, en humanos, el fumar disminuye la actividad de la monoaminoxidasa-B (MAO-B) (Fowler y cols., 1996) que es una enzima que participa activamente en el metabolismo de la dopamina. A pesar de los datos epidemiológicos y experimentales, no todos los investigadores comparten la teoría neuroprotectora del tabaco en la EP (Poewe y cols., 1983; Golbe y cols, 1986) y sugieren que los resultados de los estudios epidemiológicos podrían reflejar simplemente la existencia de una personalidad premórbida del paciente parkinsoniano que le predispondría a no fumar.

Algunos estudios han encontrado asociación entre la EP y la exposición ocupacional a metales como cobre y manganeso o para la exposición combinada de plomo y cobre o plomo e hierro o hierro y cobre

(Gorell y cols., 1997). Sin embargo, es necesario la realización de más estudios para confirmar estos resultados. Los estudios anatomopatológicos han demostrado que los niveles de manganeso en cerebros de pacientes con EP son normales (Larsen y cols., 1981), pero que existe un incremento de la concentración de hierro y/o aluminio en la sustancia negra (Hirsch y cols., 1991; Riedere y cols., 1989). El aluminio puede acelerar la peroxidación lipídica de la membrana en presencia de hierro conduciendo a la muerte neuronal y estudios "in vitro" demuestran que el hierro *per se* es tóxico en cultivos de células mesencefálicas. Sin embargo, los pacientes con EP no suelen presentar manifestaciones sistémicas derivadas de una posible alteración en el metabolismo del hierro y los depósitos de hierro encontrados pudieran ser simplemente un epifenómeno secundario a la degeneración de las células nigroestriatales.

Tabla 3. Factores de riesgo que se han asociado con mayor frecuencia a la EP en diversos estudios epidemiológicos.

Envejecimiento

Historia familiar de EP

Historia familiar de temblor

Vivir en ambiente rural

Consumo de agua de pozo

Contacto con pesticidas y conservantes de la madera

Historia de traumatismo craneal severo

Tóxicos industriales (industrias del papel, hierro, cobre, químicas)

No fumar

2.2. Factores genéticos

La existencia de *antecedentes familiares de EP* o de *temblor* constituye el factor de riesgo principal, a parte del *envejecimiento*, para desarrollar la EP (De Michele y cols., 1996; Taylor y cols., 1999) (tabla 3). En los últimos años, la posibilidad de que existan factores genéticos predisponentes, o más aún la posibilidad de que la enfermedad esté genéticamente determinada, ha propiciado el desarrollo de una intensa labor investigadora.

2.2.1 Estudios de agregación familiar

2.2.1.1. Estudios de casos-contróles

Los estudios de casos-contróles han permitido identificar una historia de Parkinson familiar entre el 13% y el 33% de los casos (Seidler y cols., 1996; De Michele y cols., 1996; Semchuk y cols., 1993; Payami y cols., 1994; Bonifati y cols. 1995), lo que supone que los familiares de pacientes con EP tienen un riesgo entre 3,5 y 14,6 veces mayor que los familiares de los contróles para desarrollar la enfermedad (Tabla 4). El patrón de herencia de muchos de estos casos es compatible con una herencia autosómica dominante con penetrancia reducida, siendo el riesgo máximo de desarrollar la enfermedad de un 20% para los familiares de primer grado (Payami y cols., 1994).

Algunos estudios han demostrado además la existencia de una *anticipación genética*, es decir, que la enfermedad tiende a aparecer en una edad más temprana en los descendientes (Bonifati y cols. 1995; Planté-Bordeneuve y cols., 1995). Sin embargo, no se han podido identificar rasgos clínicos diferenciadores entre los casos familiares y los esporádicos en la mayoría de estudios, excepto una tendencia a un inicio más precoz de la enfermedad en los casos familiares en uno de estos estudios (Bonifati y cols., 1995)

Tabla 4. Estudios casos-controles que muestran una frecuencia aumentada de EP en los familiares de primer y segundo grado de los pacientes con respecto a los controles. El “odds ratio” indica el número de veces por el que se multiplica el riesgo de desarrollar la enfermedad en los familiares de los pacientes con respecto a los controles.

Estudio	Nº casos (% con historia familiar)	Nº controles (% historia familiar)	Odds ratio
Semchuk et al.,1993	130 (22,7)	260 (6,3)	3,7
Payami et al., 1994	114 (16)	114 (4)	3,5 *
Bonifati et al.,1995	100 (24)	100 (6)	4,9
De Michele et al.,1996	116 (32,7)	232 (3,4)	14,6 *
Seidler et al., 1996	343 (13,4)	365 (1,3) ^a	12,6
		359 (2,5) ^b	5,0

* Sólo se consideraron familiares de primer grado afectos. ^a Los controles eran vecinos. ^b Los controles eran habitantes de la región.

2.2.1.2. Estudios clínicos en gemelos

En contraposición a los resultados de los estudios de casos-controles, los estudios clínicos en gemelos no han sido capaces de concluir si los factores genéticos juegan algún papel en la EP (Johnson y cols., 1990; Vieregge y cols., 1992). Las primeras investigaciones, llevadas a cabo con un número

relativamente pequeño de casos, encontraron un rango de concordancia, para el desarrollo de la EP, similar en los gemelos monozigóticos y dizigóticos (Marsden, 1987; Märtila y cols., 1988; Ward y cols., 1983). Un estudio más recientemente, con una muestra mucho mayor, en el que se incluyeron en el análisis final 161 parejas de gemelos, con posible o probable EP en al menos uno de ellos, encontró afectación del otro gemelo en 21 casos. Al igual que en los estudios previos, el rango de concordancia fue similar entre monozigotos y dizigotos (Tanner y cols., 1999), lo cual no apoya que un supuesto componente genético sea determinante en el desarrollo de la enfermedad, ya que si así fuese, se debería esperar un rango de concordancia superior en los gemelos monozigóticos.

Tanto los estudios de casos-contróles como los estudios en gemelos se basan, en muchas ocasiones, en datos obtenidos por cuestionarios o entrevistas, y además suelen ser estudios transversales, en los que no se considera una posible afectación subclínica de los sujetos incluidos en el estudio. Todo ello hace que puedan existir sesgos en uno u otro sentido a la hora de analizar los datos (Bandmann y cols., 1998).

2.2.1.3. Estudios con tomografía de emisión de positrones (PET)

Los estudios con tomografía de emisión de positrones con ^{18}F -Dopa son útiles para detectar posibles casos presintomáticos, lo que supone una cierta ventaja sobre los estudios clínicos que pueden valorar como normales a sujetos que potencialmente podrían desarrollar la enfermedad en un futuro.

En un estudio realizado en gemelos, uno de los cuales estaba afecto por la EP, se reportó una disminución de la captación del marcador en los ganglios basales (compatible con EP subclínica) en el 45% de los gemelos “sanos” monozigóticos frente al 29% de los dizigóticos (Burn y cols., 1992). Sin embargo, la edad media de ambos grupos era significativamente mayor en el grupo de los gemelos monozigóticos, por lo que no se puede obviar el efecto de la edad en la disminución del funcionalismo nigroestriatal (Bandmann y cols., 1998). Un estudio más reciente, longitudinal, con un seguimiento entre 1 y 7 años, en gemelos mono y dizigóticos de una edad media parecida, ha reportado una concordancia del 75% para los monozigóticos frente al 22% de los dizigóticos (Piccini y cols., 1997). Otros estudios con PET han demostrado en varias familias con EP, la existencia de un daño subclínico en miembros no afectados (Sawle y cols., 1992) en una frecuencia superior a lo que los estudios clinico-genéticos sugieren. Sin embargo, ninguno de estos estudios puede excluir totalmente la posibilidad de que determinados factores ambientales puedan ser determinantes, *per se*, en el desarrollo de la enfermedad, ya que no se puede descartar que los miembros de las familias estén expuestos a los mismos supuestos “tóxicos” ambientales y que los gemelos monozigóticos, al compartir la misma placenta puedan estar sometidos a los mismos “insultos” intrauterinos o al ser del mismo sexo tiendan a compartir actividades, y por tanto exposiciones similares, en la infancia y en la vida adulta (Golbe, 1999).

A pesar de estos resultados contradictorios, y de que la mayoría de casos de EP son esporádicos, se han encontrado datos incuestionables de la

influencia de los factores hereditarios en algunos casos de EP. Así, es conocida la existencia de familias integradas por múltiples miembros afectados a lo largo de varias generaciones, con EP anatomopatológicamente demostrada y con un claro patrón de herencia autosómico dominante y penetrancia completa (Degl'Innocenti y cols., 1989; Golbe y cols., 1990; Golbe y cols., 1996; Gasser y cols., 1994; Waters y Miller 1994; Maraganore y cols., 1991).

2.2.2 Estudios de genética molecular

2.2.2.1. Enzimas involucradas en el metabolismo de la dopamina y de otras sustancias tóxicas

Varios polimorfismos y mutaciones en genes que codifican para diversos enzimas relacionados con el metabolismo de tóxicos o de la dopamina han sido investigados. La **debrisoquina hidroxilasa** es una enzima codificada por el gen CYP2D6, cuya región codificante está compuesta por 9 exones. Es una enzima que se encarga del metabolismo de múltiples fármacos, incluidos antidepresivos, antiarrítmicos y antihipertensivos. Debido a su acción detoxificante, defectos de esta enzima podrían favorecer la metabolización deficiente de determinadas sustancias tóxicas endógenas o ambientales potencialmente capaces de producir un daño en las neuronas dopaminérgicas nigrales con el consiguiente desarrollo de la EP. Los estudios para intentar averiguar si la debrisoquina hidroxilasa está o no involucrada en el desarrollo de la EP no han resultado concluyentes (Tabla 5). Algunos estudios han encontrado que el riesgo asociado a la presencia de determinados alelos se

modifica en función de la edad; así el análisis del alelo B, consistente en el cambio de una guanina por una citosina (transición G a C) en la unión del intron 3 con el exon 4, sólo mostró una moderada significación estadística, al comparar pacientes con controles, cuando la enfermedad se iniciaba por encima de los 60 años (Planté-Bordeneuve y cols., 1994a; Lucotte y cols., 1996). Sin embargo, en pacientes con EP, menores de 51 años no se ha encontrado una mayor frecuencia de metabolizadores lentos (Steiger y cols., 1992) o de alelos mutados (Sandy y cols., 1996) que en los controles.

La **tirosina hidroxilasa (TH)** es la enzima que cataliza la conversión de L-tirosina en L-dopa, lo que constituye el primer paso limitante en la biosíntesis de catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina). El gen de la TH está formado por 14 exones. Se han descrito varios casos de parkinsonismo de inicio en la infancia, con respuesta a levodopa, asociados a mutaciones en el gen de la TH (Ludecke y cols., 1996; Brautigam y cols., 1998). Al igual que ocurre con la debrisoquina hidroxilasa existen estudios a favor y en contra de una posible implicación de la TH en la susceptibilidad genética para el desarrollo de la EP (Tabla 5).

La **monoamino-oxidasa (MAO)** es una enzima que juega un papel importante en el metabolismo oxidativo de la dopamina. Existen dos formas, la MAO A y la B. Los genes de la MAO están localizados en el cromosoma X. La MAO ha sido implicada en la etiopatogenia de la EP a través de su capacidad para inducir la formación de radicales libres y de peróxido de hidrógeno, potencialmente tóxicos para la neurona (Riederer y cols., 1989; Cohen y cols., 1994) Además la MAO-B transforma la 1 metil 1-4-fenil-1,2,3,6-

tetrahidropiridina (MPTP) en su neurotoxina activa, la 1-metil-4-fenil piridina (MPP+) (Nagatsu, 1997). Los estudios de casos-contróles también han mostrado resultados discordantes en cuanto a si determinados polimorfismos pueden ser factores de riesgo para sufrir EP (tabla 5).

Los estudios de ligamiento en casos familiares de EP tampoco han demostrado una asociación entre el gen de la debrisoquina hidroxilasa (Planté-Bordeneuve y cols., 1994a; Gasser y cols., 1994), o el de la TH (Planté-Bordeneuve y cols., 1994b; Gasser y cols., 1994) o el de la MAO-A y B (Planté-Bordeneuve y cols., 1997) con la EP, lo que sugiere que dichos genes no son un determinante mayor en la susceptibilidad genética para desarrollar la enfermedad.

Como ya se ha comentado previamente, el estrés oxidativo puede contribuir a los procesos degenerativos de la EP. Mediante estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos contra la **cobre-zinc superóxido dismutasa (SOD1)** se ha visto que muchos cuerpos de Lewy tiñen para esta enzima lo que sugiere que la SOD1 podría jugar un papel en la neurodegeneración asociada a la EP (Nishiyama y cols., 1995). Además, la actividad SOD es mayor en pacientes con EP en estadios iniciales (I y II de Hoehn y Yahr) que en pacientes con EP en estadios avanzados (III y IV) lo que sugiere que con el avance de la enfermedad, la actividad SOD va disminuyendo, aunque no se sabe si esto es debido a un deterioro del mecanismo antioxidante o simplemente es un epifenómeno de la enfermedad (Bostantjopoulou y cols., 1997). En 2 estudios diferentes no se han encontrado mutaciones en la SOD 1 en casos familiares y esporádicos

de EP (Parboosingh y col., 1995; Bandmann y col., 1995), por lo que no se ha podido relacionar directamente esta enzima con el desarrollo de la enfermedad.

Recientemente, un meta-análisis de los resultados de los diversos polimorfismos reportados en 84 estudios de la literatura ha identificado cuatro polimorfismos que parecen estar asociados a la EP: acetiladores lentos de la N-acetiltransferasa 2 (NAT2), polimorfismo (GT)_n de la MAOB superior a 188 pb, delección del alelo GSTT1 de la glutathion transferasa y el polimorfismo A4336G de tRNA^{Glu} (Tan y cols. 2000). Sin embargo, los autores remarcan que en la mayoría de estudios los resultados fueron negativos y que en algunos casos al excluir el resultado más positivo del meta-análisis, éste se hace negativo.

Tabla 5. Principales estudios de casos-controles a favor y en contra del papel de diversos genes en la etiopatogenia de la EP.

Genes	A favor	En contra
Debrisoquina hidroxilasa	Armstrong y cols.,1992 Smith y cols.,1992 Kurth y Kurth, 1993	Bordet y cols., 1994 Gasser y cols., 1994 y 1996 Diederich y cols., 1996 Planté-Bordeneuve y cols., 1994a
Tirosina hidroxilasa	Kurth y Kurth, 1992	Planté-Bordeneuve y cols.,1994 Gasser y cols., 1994
MAO-A	Hotamisliligil y cols.,1994	Kurth y cols., 1993 Nanko y cols., 1996
MAO-B	Kurth y cols.,1993 Costa y cols., 1997	Hotamisliligil y cols.,1994 Ho y cols.,1995 Morimoto y cols., 1995 Nanko y cols., 1996
SOD1		Parboosingh y cols., 1995 Bandmann y cols., 1995

2.2.2.2 α 1-antiquimotripsina

Otra enzima que se ha implicado en los mecanismos patogénicos de la EP es la α 1-antiquimotripsina (ACT). El gen de la ACT se localiza en el brazo largo del cromosoma 14. Estructuralmente pertenece a una familia de genes inhibidores de la proteasa de la serina, que incluye los genes que codifican para la α 1-antitripsina, la proteína C inhibidora, la proteína ligada a corticoesteroides (Byth et al., 1994). Es una glicoproteína sérica con un peso molecular de 69 kDa y se sintetiza en el hígado. La ACT es una enzima que interfiere en los procesos proteolíticos a nivel pulmonar y a nivel del músculo liso de los vasos sanguíneos. Al igual que la lipoproteína APOE, la ACT se une con alta afinidad al péptido β -amiloide en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer (Rozemuller y cols., 1991). Se ha reportado en la población japonesa una mayor incidencia del genotipo ACT-AA en los pacientes con EP (19,9%) en comparación con los controles sanos (8.3%) (Yamamoto y cols., 1997). Estos autores calculan un riesgo para desarrollar la EP de 2.73 en los portadores de dicho genotipo en relación a los portadores del genotipo ACT-AT o ACT-TT.

2.2.2.3. Receptor D2 de la dopamina

La posibilidad que los receptores de la dopamina puedan jugar un papel en la etiopatogenia o en la fisiopatología de las complicaciones motoras de la enfermedad ha sido investigada en diversos estudios (Wang y cols., 2001). En

un estudio realizado en la población anglo-francesa se analizó un polimorfismo (TG/CA) en el segundo intron del gen del receptor D2 de la dopamina (DRD2) y se obtuvo que los sujetos homocigotos para el alelo 3 eran 2.3 veces más frecuentes en los casos de EP, sugiriendo una asociación entre dicho alelo y el desarrollo de la EP (Plante-Bordeneuve y cols., 1997). El DRD2 se localiza principalmente en el neostriado y en la pars compacta de la sustancia negra, siendo la diana preferente de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales que controlan la función motora en la EP.

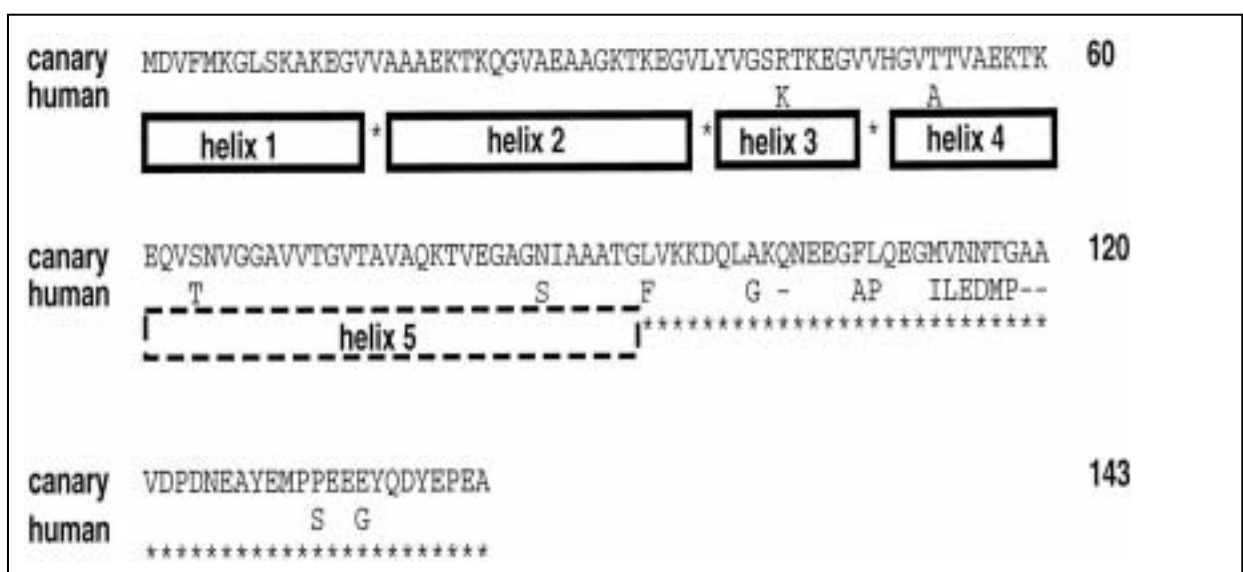
También en otro estudio con población europea se ha reportado que la frecuencia de alelos con seis o más repeticiones en el exon 3 del receptor D4 de la dopamina (DRD4) es significativamente mayor en pacientes con EP que en controles ($p = 0.039$) (Ricketts y cols., 1998). Sin embargo, la implicación de los receptores de la dopamina en la EP no ha sido corroborada en otros estudios (Nanko y cols. 1993; Higuchi y cols., 1995; Wan y cols. 1999; Kronenberg y cols., 1999).

2.2.2.4. α -sinucleína

La α -sinucleína es una proteína presináptica de 140 aminoácidos codificada por un gen localizado en el cromosoma 4q21-22 (Ueda et al., 1993), que es expresada solamente en tejidos del sistema nervioso (Maroteaux et al., 1988) y que comparte un parecido estructural con las apolipoproteínas y la proteína 14-3-3 (Ostrerova y cols. 1999). La α -sinucleína libre no está plegada, pero su región N-terminal muestra preferencia para la adopción de una

conformación α -helicoidal (Davidson y cols., 1998) que puede ser importante en la agregación en fibrillas (Eliezer y cols., 2000). En el ser humano, se han descrito además de la forma entera, dos RNAm diferentes producidos por el “splicing” alternativo del gen que dan lugar a una α -sinucleína de 126 aminoácidos y otra de 112 resultantes de la falta de transducción de los codones 41 al 54 y del 103 al 130, respectivamente (Ferrer, 2001). En condiciones normales la α -sinucleína está fosforilada. En la fosforilación se han implicado las enzimas caseincinasa I y II. La actividad de la α -sinucleína podría depender de los mecanismos de fosforilación-defosforilación (Okochi y cols. 2000)

Figura 1. Secuencia primaria y estructura predictiva de la α -sinucleína en el canario y en el humano.



La función de la α -sinucleína es desconocida pero parece que en los pájaros estaría implicada en el desarrollo del sistema de control del canto y se especula que juega un papel en la plasticidad de las membranas (Clayton y George, 1998). En humanos la α -sinucleína ha sido implicada en la enfermedad de Alzheimer, en la enfermedad de Parkinson, en la enfermedad por cuerpos de Lewy difusos y en la atrofia multisistémica. En las placas seniles de la enfermedad de Alzheimer se ha identificado un fragmento de la α -sinucleína que se describió inicialmente como un precursor del componente no beta-amiloide (NACP), por lo que se ha sugerido una conexión entre el metabolismo de las proteínas presinápticas y la formación de amiloide (Masliah et al., 1996, Iwai et al., 1996). Asimismo, se ha descrito una alteración en la α -sinucleína de los cuerpos de Lewy en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer familiar ligada a mutaciones en la presenilina y el precursor del amiloide (Lippa et al., 1998). En la EP y en la enfermedad por cuerpos de Lewy difusos, la α -sinucleína se considera un componente fundamental de los cuerpos de Lewy, ya que éstos se tiñen intensamente con anticuerpos específicos (Spillantini y cols., 1997). Además, recientemente, se ha identificado en las inclusiones citoplasmáticas gliales y neuronales de pacientes con atrofia multisistémica (Wakabayashi et al., 1998). Todo ello sugiere que la agregación de α -sinucleína podría ser un proceso común a varias enfermedades neurodegenerativas.

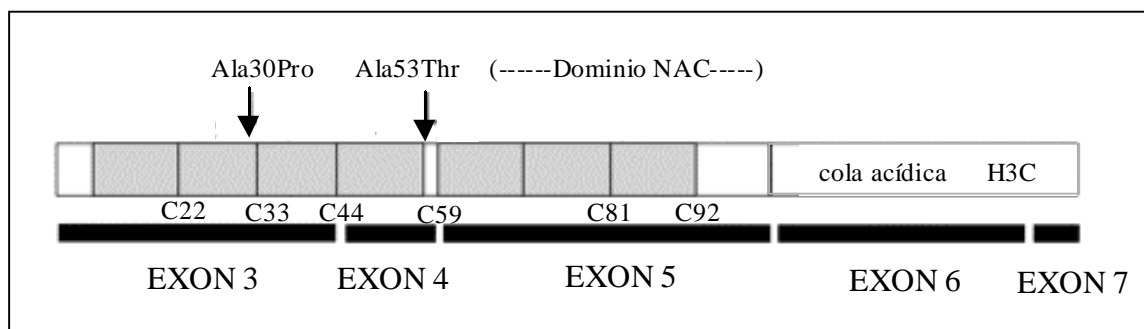
Uno de los principales avances en la genética de la EP ha sido la detección de una mutación en el gen de la α -sinucleína consistente en la sustitución de una alanina por una treonina en el residuo 53 (Ala53Thr) del exon 4 (figura 2) en una familia de origen italiano con múltiples miembros afectados a lo largo de varias generaciones y en otras 3 familias griegas no relacionadas (Polymeropoulos y cols., 1997). Este descubrimiento ha significado una auténtica revolución en la genética de la EP, ya que constituye la primera evidencia directa de que la EP puede ser debida a un defecto genético. A pesar de que los pacientes afectados por esta variedad de EP presentan algunos rasgos clínicos atípicos (Golbe y cols, 1996; Spira y cols. 2001) (Tabla 6), los estudios anatomopatológicos practicados confirman el diagnóstico de EP. Poco después de este descubrimiento se encontró una nueva mutación en el exon 3 de dicho gen (Krüger y cols., 1998) en una familia alemana con EP familiar consistente en la sustitución de una alanina por una prolina en el codón 30 (Ala30Pro) (figura 2).

Ambas mutaciones ocurren en una región codificante adyacente a una secuencia de consenso repetitiva formada por los aminoácidos KTKEGV en la región amino-terminal (Golbe, 1999). Se cree que estas mutaciones son capaces de inducir un cambio conformacional en la α -sinucleína (Kawamata y cols., 2001) facilitando así su precipitación en el citosol neuronal (Kahle y cols., 2000). También estudios celulares "in vitro" sugieren que la α -sinucleína mutada podría inducir una menor actividad del proteasoma (Tanaka y cols., 2001) y una mayor sensibilidad neuronal al estrés oxidativo (Ko y cols., 2000), lo que conduciría a una disfunción mitocondrial y a la muerte neuronal.

Tabla 6. Características clínicas de los pacientes con la mutación Ala53Thr del gen de la α -sinucleína

<p>Herencia autosómica dominante</p> <p>Edad media de inicio alrededor de 45 años</p> <p>Curso rápidamente progresivo</p> <p>Supervivencia media de unos 10 años</p> <p>Buena respuesta a levodopa</p> <p>Menor incidencia de temblor</p> <p>Mayor incidencia de demencia</p>	<p>Características adicionales:</p> <p>Hipoventilación central</p> <p>Hipotensión ortostática</p> <p>Incontinencia urinaria</p> <p>Mioclónicas</p>
---	---

Figura 2. Localización de las mutaciones descritas en el gen de la α -sinucleína.



2.2.2.5 Gen Parkin

El parkinsonismo juvenil autosómico recesivo (ARJP) es un trastorno neurodegenerativo hereditario caracterizado por una buena respuesta a la levodopa y una edad de media de inicio por debajo de los 30 años. Desde el punto de vista clínico, las características más comúnmente reportadas figuran en la Tabla 7.

Desde el punto de vista anatomopatológico se ha descrito una pérdida de neuronas de la sustancia negra y el locus ceruleus en los pacientes con ARJP, similar a la descrita en la EP, pero sin la presencia de los característicos cuerpos de Lewy (Yamamura y cols., 1993, 2000; Takahashi y cols.; Mori y cols., 1998).

Tabla 7. Características clínicas de los pacientes con ARJP

Herencia autosómica recesiva	<u>Signos clínicos prominentes:</u>
Edad media de inicio < 30 años	Hiperreflexia
Parkinsonismo moderado	Distonía del pie
Lenta progresión	Bloqueos de la marcha
Respuesta satisfactoria a levodopa	Alteración de reflejos posturales
Aparición precoz de discinesias por levodopa	Mejoría después del sueño
Deterioro fin de dosis	

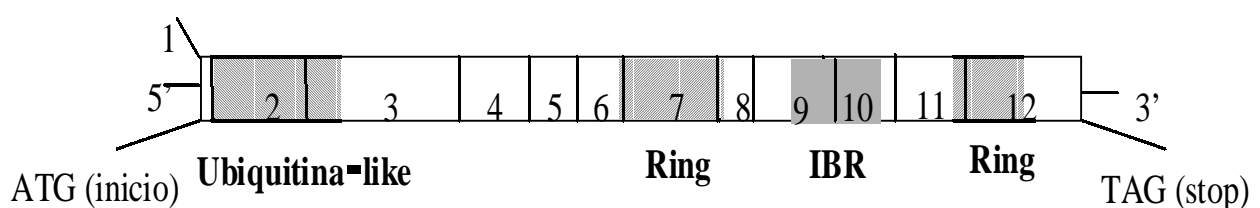
El gen responsable para el desarrollo de la enfermedad ha sido identificado en un locus del cromosoma 6q25.2-27 (Matsumine y cols., 1997) y ha sido denominado *gen parkin*. Este gen contiene más de 500 kilobases y está constituido por 12 exones que codifican para una proteína de 465 aminoácidos. Inicialmente, deleciones en varios exones de dicho gen, fueron identificadas como las causantes de la enfermedad en varias familias con AR-JP (Kitada y cols., 1998). Otros estudios en familias europeas y japonesas con parkinsonismo de inicio precoz, pero no juvenil, con respuesta a levodopa, también mostraron ligamiento en el cromosoma 6 (Tassin y cols., 1998, Matsumine y cols., 1998). Asimismo se ha descrito la presencia de un amplio número de mutaciones (Lücking y cols., 2000) en el gen parkin, incluso se ha descrito mutaciones en sujetos con inicio de la enfermedad a una edad similar a la EP. Todo ello sugiere que el espectro genotípico y fenotípico de la enfermedad asociada a mutaciones del gen parkin es más amplio de lo que inicialmente se había supuesto.

La proteína parkina está ampliamente distribuida por el cerebro y predomina en la sustancia negra, en el citoplasma de las neuronas pigmentadas que contienen melanina. En algunos estudios autopsicos se ha visto que la proteína parkina no es expresada en el cerebro de pacientes con ARJP (Shimura y cols. 1999).

Se cree que la proteína parkina es una ligasa de la ubiquitina, colaborando estrechamente con la enzima conjugadora de la ubiquitina UbcH7 en la degradación proteica (Shimura y cols., 2000). La secuencia de

aminoácidos de la proteína parkina en la posición N-terminal presenta una homología con la con la ubiquitina (32% de identidad y 62% de similitud). El residuo lisina en la posición 48, que es esencial para la formación de la cadena multi-ubiquitinada está conservado (Shimizu y cols., 2000); sin embargo faltan dos residuos también importantes en la ubiquitinización como son una lisina en la posición 63 y una glicina en la posición 76 (Nussbaum, 1998). El resto de la proteína parkina es rico en cisteína, y en la región C-terminal presenta una estructura en RING-finger motif, lo que sugiere que la parkina puede ser considerada como un factor de transcripción de la familia RING-finger y/o como una nueva proteína zinc-finger (Shimizu y cols., 2000). Otros análisis han demostrado que la proteína contiene diversas secuencias de aminoácidos que se corresponden con secuencias de consenso para el lugar de fosforilación de la casein-kinasa II (CK-II). Además la parkina parece contener lugares de fosforilación adicionales para la proteín-kinasa C, proteín-kinasa A y la proteín tirosina kinasa. Todo ello sugiere que la parkina es al igual que la α -sinucleína una proteína fosforilada (Shimizu y cols., 2000).

Figura 3. Representación esquemática de la proteína parkina con los exones correspondientes y los dominios funcionales más importantes.



2.2.2.5 Otros genes

En 1998 se reportó la presencia de una mutación (Ile93Met) en el gen de la enzima hidrolasa carboxiterminal de la ubiquitina L1 (UCH-L1) en una familia alemana con EP de herencia autosómica dominante (Leroy y cols., 1998), sin embargo, el estudio de este gen en otros casos de EP no ha mostrado la presencia de mutaciones sugiriéndose que se trataría de una rara causa de EP (Harhangi y cols. 1999; Maragarone y cols. 1999; Wintermeyer y cols. 2000).

Otros posibles locus asociados a EP se han situado en el cromosoma 2p13 en varias familias de origen europeo (Gasser y cols., 1998) y en el cromosoma 4p en una familia por EP autosómica dominante, algunos de cuyos miembros presentaban temblor esencial (Farrer y cols., 1999). Recientemente también se ha descrito asociación en el cromosoma 1p35-36 en una familia de origen italiano con EP de herencia autosómica recesiva y que se caracterizaba clínicamente por una edad de inicio precoz (32-48 años), una lenta progresión y una respuesta mantenida a la levodopa (Valente y cols., 2001).

Los principales genes y locus cromosómicos que se han relacionado, hasta ahora, con la enfermedad de Parkinson familiar figuran en la Tabla 8.

Tabla 8. Principales genes y locus genéticos implicados en la EP familiar

Gen de la α -sinucleína (PARK1)

Ala53Thr (Polymeropoulos et al., 1997)

Ala30Pro (Krüger et al., 1998)

Gen parkin (PARK 2) (Kitada et al., 1998)

Locus 2p13 (PARK 3) (Gasser et al., 1998)

Locus 4p14-16.3 (PARK 4) (Farrer et al., 1999)

Gen de la hidrolasa L1 carboxi-terminal de la ubiquitina (PARK 5)

Mutación Ile93Met (Leroy et al., 1998)

Locus 1p35-36 (PARK 6)(Valente et al., 2001)

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPOTESIS

Numerosos estudios indican que los factores genéticos pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. En los casos familiares, los factores genéticos pueden ser determinantes, mientras que en los casos esporádicos, los factores genéticos podrían actuar como un factor de riesgo, modulando el efecto de posibles factores ambientales.

Las hipótesis de este trabajo son:

- 1) La presencia de polimorfismos en el gen de la α_1 -antiquimotripsina y del receptor D2 de la dopamina pueden inducir una susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.
- 2) Mutaciones en el gen de la α -sinucleína o en el gen parkin pueden ser responsables de algunos casos de enfermedad de Parkinson familiar en nuestra población.
- 3) Podrían existir rasgos clínicos diferenciadores entre los casos familiares y esporádicos de enfermedad de Parkinson.

2. OBJETIVOS

Objetivos principales

1.- Analizar si el genotipo AA del gen de la α_1 -antitripsina y el alelo 3 del polimorfismo TG/CA del gen del receptor D2 de la dopamina podrían inducir una susceptibilidad genética para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson en la población española.

2.- Estudiar la presencia de la mutación Ala53Thr u otras mutaciones del gen de la α -sinucleína y de mutaciones del gen parkin en pacientes con enfermedad de Parkinson familiar o esporádica de inicio precoz.

Objetivos secundarios

1.- Comparar las características clínicas de los casos de enfermedad de Parkinson familiar con los casos esporádicos.

2.- Evaluar la existencia de un fenómeno de anticipación genética en los casos de enfermedad de Parkinson familiar.

III.- MATERIAL Y METODOS

1) PACIENTES

Los pacientes afectados de EP, visitados en consultas externas del Servicio de Neurología del Hospital Clínic i Universitari de Barcelona entre abril de 1997 y mayo de 2001 fueron interrogados sobre la existencia de otros miembros de la familia afectados por la enfermedad. El diagnóstico de EP se basó en criterios diagnósticos internacionalmente reconocidos (Parkinson's Disease Society Brain Bank of London). Los pacientes fueron clasificados como afectados de una EP esporádica si no existen antecedentes de la enfermedad en otros miembros de la familia, o como una EP familiar si existía algún otro miembro de primer o segundo grado afecto. En los casos en que no se pudo valorar personalmente al familiar afecto, bien porque había fallecido o bien porque estaba muy distante geográficamente, la inclusión como EP familiar se hizo siguiendo criterios previamente propuestos (Marder y cols. 1996).

2. METODOS

2.1. Evaluación Clínica

Se analizó la edad de inicio, la edad actual, el sexo, y la severidad clínica de la enfermedad con el paciente en "on" (bajo los efectos de la medicación) o en "off" (sin efecto de la medicación) mediante el examen motor de la escala unificada de la EP (UPDRS), el estadio de Hoehn y Yahr y la escala de actividades de Schawb y England. Además se analizó el subtipo clínico que

presentaban los pacientes en base a si predominaba el temblor (tremorígeno), la rigidez (rígido-acinético) o ambos (mixto). La valoración del subtipo clínico se hizo con el paciente en estadio “off” o se utilizó el último examen de la escala motora de la UPDRS con el paciente en “off” si habían transcurrido menos de 12 meses desde que se realizó esta valoración. La EP se clasificó como mixta cuando en la UPDRS la puntuación del temblor y la rigidez era igual o superior a 2 al menos en una de las extremidades. Cuando el temblor era igual o superior a 2 y la rigidez inferior a 2 en cualquier extremidad, se clasificó como predominantemente tremorígena. Cuando la rigidez era igual o superior a 2 y el temblor inferior a 2 en cualquier extremidad, se clasificó como rígido-acinético.

En los casos familiares se construyó un árbol genealógico para valorar el tipo de herencia y se analizó la posibilidad de anticipación genética cuando en una misma familia la enfermedad se manifestaba en padres e hijos.

2.2. Consentimiento informado, extracción sanguínea y aislamiento del DNA

Antes de realizar la extracción sanguínea se solicitó el Consentimiento Informado de todos los pacientes y controles sanos que desearon participar en el proyecto de forma voluntaria. No se incluyeron en el estudio a individuos menores de edad.

Se extrajeron 22,5 ml de sangre venosa anticoagulada con EDTA-K⁺ (5 tubos de 4,5 ml). Las muestras fueron procesadas el mismo día. Se diluyó la sangre con suero fisiológico y se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto

durante 10 minutos a 4° C. Se extrajo el sobrenadante y se congeló la capa celular hasta su utilización para la extracción del DNA.

Para la extracción de DNA se realizó primero una lisis de eritrocitos y el DNA fue aislado a partir de los leucocitos mediante la lisis y digestión con proteinasa K, seguido de la extracción con cloroformo y precipitación mediante etanol. La concentración y la pureza del DNA se determinó a través de la medición de la absorbancia a 260 nm mediante espectrofotometría. El DNA obtenido fue guardado congelado a -30°C en alícuotas de 100 µg/ml hasta su utilización.

2.3.- Estudio de los polimorfismos de la α -1-antiquimotripsina

Los polimorfismos alélicos de la α -1-antiquimotripsina se determinaron a partir de la amplificación de un fragmento de 124 pares de bases usando los oligonucleótidos y las condiciones previamente descritos por Kamboh et al. (1995). La mezcla para la reacción de PCR consistió en 14.9 µl de agua destilada, 4 µl de cada dNTP, 2.5 µl de tampón 10x (100 mM Tris-HCL Ph 9.0, 500 mM KCL, 1% Triton X-100), 120 ng de DNA genómico, 10 pmol de cada oligonucleótico, y 1 U de Taq polymerase. La ciclos de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial durante 4 min. a 94 °C seguida de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1.75 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, y una extensión final a 72°C durante 5 min.

Los productos de PCR fueron digeridos con 10U de la enzima MvaI (MBI Fermentas), 2.3 µl de tampón 10x, y 0.2 µl de albúmina bovina al 2% durante 3 horas a 37 °C. Posteriormente se realizó la electroforesis de los

productos de PCR en un gel de poliacrilamida al 7.5 %. El gel fue teñido con bromuro de etidio durante 20 minutos y las bandas fueron fotografiadas usando luz ultravioleta. Se pudieron visualizar tres genotipos diferentes AA, TT y AT.

Se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes con los controles. Los casos familiares también fueron comparados con los esporádicos.

2.4. Estudio de los polimorfismos del receptor D2 de la dopamina

Se amplificó mediante PCR un fragmento de 80-86 pares de bases de la región del segundo intrón del gen DRD2 que contiene una secuencia repetitiva polimórfica TG/CA usando los oligonucleótidos y las condiciones previamente publicadas (Hauge y cols., 1991). Esto permitió obtener 4 tipos de fragmentos alélicos correspondientes a 80 pares de bases (alelo 1), 82 pares de bases (alelo 2), 84 pares de bases (alelo 3) y 86 pares de bases (alelo 4).

Se compararon las frecuencias alélicas de los pacientes con los controles y los casos familiares con los esporádicos.

2.5. Estudio de la mutación Ala53Thr del gen la α -sinucleína y búsqueda de nuevas mutaciones en la región codificante y en la región 5' colindante

El DNA fue amplificado mediante PCR usando los oligonucleótidos y las condiciones previamente descritas (Polymeropoulos y cols., 1997; Farrer et al., 1998). Para la detección de la mutación Ala53Thr, los productos de PCR

fueron incubados con el enzima de restricción Tsp45 I (NEBiolabs) durante 1 hora a 65° C. Posteriormente se realizó la electroforesis en un gel de agarosa al 2%, se tiñó el gel con bromuro de etidio y los bandas fueron visualizadas y fotografiadas usando luz ultravioleta. La detección de otras mutaciones o polimorfismos se hizo mediante la técnica de “single strand conformation polymorphism” (SSCP). Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de acrilamida que posteriormente fue teñido con nitrato de plata. Los productos que presentaban una movilidad diferente fueron secuenciados.

2.6. Detección de mutaciones en el gen Parkin

Los diferentes exones del gen parkin fueron amplificados mediante PCR usando los oligonucleóticos y las condiciones de amplificación previamente descritas (Kitada y cols., 1998; Lucking y cols., 1998). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 7.5% y al 12% en varias condiciones (con/sin glicerol al 2%, a temperatura ambiente o a 4 ° C) con el objetivo de detectar cambios en el patrón de las cadenas (single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP)). Los productos de PCR fueron visualizados tras tinción con plata. Se realizó secuenciación directa de los productos de PCR que presentaban un patrón anormal de motilidad de las bandas con el objetivo de detectar mutaciones o polimorfismos.

2.7. Análisis estadístico

Para el procesamiento de los diferentes datos se utilizará un test de

ANOVA y un t-test para los pruebas paramétricas; y un test de Chi-cuadrado con la corrección de Yates en las tablas de 2x2 y una U de Mann-Whitney para las pruebas no paramétricas.

III. RESULTADOS

Los resultados obtenidos quedan reflejados en las siguientes publicaciones.

**TRABAJO 1. α_1 -ANTICHYMOTRYPSIN GENE POLYMORPHISM AND
SUSCEPTIBILITY TO PARKINSON'S DISEASE.**

α -1-Antichymotrypsin gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease

E. Muñoz, MD, V. Obach, MD, R. Oliva, MD, M. J. Martí, MD, M. Ezquerra, PhD, P. Pastor, MD, F. Ballesta, MD and E. Tolosa, MD

Neurology 1999;52:297-301

OBJECTIVE: To determine whether the α -1-antichymotrypsin AA genotype (ACT-AA) confers susceptibility for developing Parkinson's disease (PD) in the Spanish population.

BACKGROUND: A correlation between the ACT-AA genotype and the risk of developing PD has been recently reported in the Japanese population.

METHODS: The ACT genotypes of 71 patients diagnosed with clinically definite PD were compared with those of 109 age-matched healthy control subjects.

RESULTS: The authors found that the ACT-AA polymorphism frequency was not increased significantly in the PD group (31%) compared with the control group (28.4%). The ACT allelic distribution was also similar for familial and sporadic PD, for female and male patients, and for the different clinical subtypes of PD. The age at onset of PD was significantly lower in the ACT-AA patients compared with non-ACT-AA patients. When the actual age was considered, the

ACT-AA frequency was higher in PD patients <Imagen: <=>50 years old (50%) compared with that present in patients >50 years old (26.8%), but the same effect was found in control subjects.

CONCLUSIONS: The ACT-AA polymorphism is not related to an increased risk of developing PD in the Spanish population. The ACT-AA overrepresentation in PD and control subjects <Imagen: <=>50 years old suggests that this polymorphism could be associated with life-threatening conditions other than PD.

The cause of Parkinson's disease (PD) is unknown. Its clinical diagnosis remains difficult¹ and no biological marker has been described. However, during the past few decades there have been important advances in its treatment as well as in the understanding of its etiology.

Factors that have been described to be associated positively with PD include living in a rural environment, drinking well water, using pesticides, being exposed to wood preservatives, and not smoking cigarettes.²⁻⁴ However, in one study⁴ the most relevant risk factor for developing PD was the presence of a history of familial PD or essential tremor. In other studies,⁵⁻⁹ pedigree and segregation analysis suggest autosomal dominant inheritance of a gene or genes in a subset of families with Lewy body PD. Therefore, there is an increasing interest concerning the role of genetic factors in the etiology of PD. In the last year, two mutations in the <Imagen: {alpha}>-synuclein gene have been identified as being responsible for PD in a few families.^{10,11} However, these mutations are a rare cause of PD.¹⁰⁻¹² Although the role of genetic factors in sporadic PD remains unclear, it seems likely that sporadic PD cases also could be caused by the combined effect of environmental precipitating factors and the presence of a genetic

susceptibility.

Recently, a correlation between the α -1-anti-chymotrypsin AA genotype (ACT-AA) and PD was found in the Japanese population.¹³ We initiated the current study to determine whether the ACT-AA polymorphism is also associated with an increased risk of developing PD in the Spanish population.

Methods

A total of 71 patients (30 women and 41 men) diagnosed as having clinically definite PD following the PD Society Brain Bank diagnosis criteria¹ were included in the current study. The mean age of the PD patients was 65 years (range, 34 to 85 years). In addition, 109 healthy control subjects (47 women and 62 men) without clinical evidence of tremor, parkinsonism, or familial history of PD were also included in the study. The mean age of the control subjects was 60 years (range, 28 to 82 years). Both patients and control subjects were recruited from the neurology service at the Hospital Clínic Universitari in Barcelona. The distribution by age of the control subjects and the PD patients is shown in figure 1.

Figure 1. Distribution of PD patients and control subjects according to age.

Familial PD was diagnosed using the criteria of Marder et al.¹⁴ The clinical type of PD was classified as tremoric, rigid-akinetic, and mixed when tremor and rigidity were present in a patient. Clinical assessment was made using the Unified Parkinson's Disease Rating Scale

(UPDRS, motor examination), the modified Hoehn and Yahr stages, and the modified Schwab and England Scale.¹⁵

Blood samples were drawn after informed consent was obtained, and the leukocytes were isolated from 9 mL of blood samples through erythrocytic lysis and centrifugation. The DNA was isolated from the leukocytes via proteinase K digestion, chloroform extraction, and ethanol precipitation. Subsequently, the ACT allelic polymorphism was determined via amplification of a 124-base pair fragment using the primers and conditions reported previously.¹⁶ The PCR mix consisted of 14.9 μ L distilled water, 4 μ L of each dNTP, 2.5 μ L 10x buffer (100 mM Tris-HCl [pH, 9.0], 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 120 ng genomic DNA, 10 pmol of each primer, and 1 U of Taq polymerase. The cycling conditions consisted of an initial denaturation for 8 minutes at 94 °C followed by 30 cycles of 1 minute at 94 °C, 1.75 minutes at 55 °C, and 2 minutes at 72 °C, and a final extension at 72 °C for 5 minutes. The PCR products were digested with 10 U of the enzyme MvaI (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania), 2.3 μ L 10x buffer, and 0.2 μ L 2% bovine serum albumin for 3 hours at 37 °C, and electrophoresed in a 7.5% polyacrylamide gel. After staining the gel for 20 minutes with ethidium bromide, the bands were visualized and photographed under ultraviolet light. MvaI-digested PCR products from individuals detected all three different genotypes at the ACT locus (AA, TT, and TA).

Subsequently we compared the ACT allelic frequencies of the PD patients and the control subjects, and searched for correlations between the ACT-AA polymorphism and familial or sporadic PD status, age at onset, gender, and clinical subtype of PD. Statistical assessments were made using chi-square analysis with the Yates' correction for 2 x 2 tables and Student's t-test.

Results

The relevant clinical data and the genotyping results for both PD patients and control subjects are shown in the table. We did not find significant differences between PD patients and control subjects regarding ACT allelic distribution. The ACT-AA genotype was present in 31% of patients and in 28.4% of control subjects. A familial history of PD was present in 27 patients whereas 38 patients had sporadic PD. In six patients the familial history of PD was not clear.¹⁴ The ACT-AA frequency was not different in familial cases of PD (29.6%) compared with the sporadic cases of PD (29%).

Table 1. α -1-Antichymotrypsin genotypes in PD patients and control subjects

The mean age at onset for all PD patients was 55 years (range, 27 to 75 years). The mean and SD of the age at onset was 51 ± 11 years for the ACT-AA bearers, 56 ± 11 years for the ACT-TA bearers, and 58 ± 10 years for the ACT-TT bearers. We found that the age at onset was decreased significantly in the ACT-AA bearers compared with the ACT-AA nonbearers ($p = 0.035$; figure 2). When we compared the frequency of the ACT-AA genotype of PD patients with an onset of ≤ 50 years to that present in patients with an onset of > 50 years we found a trend for the ACT-AA genotype to be present at a higher frequency in PD patients with an onset younger than 50 years (41.6% for ≤ 50 years and 25.5% for > 50 years), but this finding was not statistically significant ($p = 0.2$). However, when the actual age was analyzed we found that the ACT-AA genotype was present at a significantly higher frequency in PD patients of ≤ 50 years (50%) compared with that present in those who were > 50 years (26.8%; $\chi^2 = 4.6899$; $df = 1$; $p = 0.035$). In control subjects the ACT-AA frequency was also significantly higher in individuals who were ≤ 50 years (44.8%)

compared with that present in individuals who were >50 years (22.5%; $\chi^2 = 4.1743$; $df = 1$; $p = 0.04$).

Figure 2. Cumulative percent of the α -1-antichymotrypsin genotype according to the age at onset of PD (n = 71).

Mixed parkinsonism, diagnosed in 36 patients (50.7%), was the most frequent clinical manifestation of the disease. The stratification of the PD genotypes by clinical subtype and gender did not exhibit statistical differences in the ACT genotype or allelic distribution.

The mean duration of the disease was 10.9 years for the ACT-AA bearers, 8.4 years for the ACT-TA bearers, and 9.3 years for the ACT-AA bearers. The UPDRS, the Hoehn and Yahr stage, and the Schwab and England Scale when in the "off" stage did not show differences for the different ACT genotypes (see the table).

Discussion

In this study we investigated whether the ACT polymorphism is a risk factor for developing PD in Spanish sporadic and familial patients. The ACT gene is located on the long arm of chromosome 14 and belongs to a cluster of structurally related serine protease inhibitor genes that include the genes encoding the α -1-antitrypsin, the protein C inhibitor, and the corticosteroid-binding protein.¹⁷ ACT is a serum glycoprotein, with a molecular mass of 68 kDa, and is synthesized in the liver. The ACT physiologic function is not yet known, but like

apolipoprotein E, ACT binds with a high affinity to β -amyloid peptide in the brain of patients with AD.¹⁸ Although some authors have found that the ACT-AA genotype is associated with an increased risk of AD,^{16,19,20} others have not found such an association.^{21,22}

Recently, Yamamoto et al.¹³ found a higher incidence of the ACT-AA genotype in PD patients (19.9%) compared with healthy control subjects (8.3%) in the Japanese population. These authors determined that the odds ratio for developing PD in individual ACT-AA bearers was 2.73 compared with the ACT-AT and ACT-TT genotypes. However, our study demonstrates a similar percentage of the ACT-AA genotype in the PD group compared with the control group, and therefore does not provide evidence that the ACT-AA polymorphism confers susceptibility to developing PD in the Spanish population. Our results also point out different ACT allelic frequencies in the Spanish population compared with the Japanese population. Although the ACT-AT polymorphism is present at a similar frequency in both populations (approximately 50%), the ACT-AA genotype is present at a higher frequency in Spain compared with Japan in both PD patients and in healthy control subjects. However, the ACT genotype distribution in the Spanish population is similar to that found by Kamboh et al.¹⁶ in American whites. The differences between white and Japanese populations could be due to their different ethnic origin.

Familial PD is clinically indistinguishable from sporadic cases of idiopathic PD^{6,8} except for a somewhat lower age at onset in familial patients reported in one study.⁹ There is an increased risk of developing PD in first-degree relatives of both sporadic and familial patients. When the siblings of probands with affected parents were considered, the cumulative risk increased significantly over that of siblings of probands without affected parents, suggesting significant familial aggregation in a subset of randomly ascertained families.⁵ If the ACT-AA genotype is a

major determinant for developing PD, a familial clustering could be expected. However, in our study, familial PD patients did not show a different ACT allelic distribution compared with sporadic PD patients.

The role of gender in PD susceptibility is unknown. Recent studies^{23,24} have not found significant differences between men and women in PD prevalence. However, in one study¹⁴ it was reported that the risk of developing PD in male first-degree relatives is higher than in female relatives. Therefore, the possibility that gender modifies the risk of PD in association with other genetic factors could not be ruled out. In our study, the detection of a similar ACT-AA frequency between men (31.7%) and women (30%) with PD indicates that gender does not modify the risk of developing PD in ACT-AA bearers.

Idiopathic PD is a pathologic entity characterized by the loss of substantia nigra dopaminergic neurons and the presence of Lewy bodies in the surviving neurons. However, PD clinical expression varies among patients. Some people present with tremor and akinesia, others with rigidity and akinesia, and others with a mixed form. The presence of different clinical subtypes may suggest a different involvement of neuronal subpopulations. This could argue for the existence of different genetic or nongenetic factors leading to the selective degeneration of such neurons. We have not found a correlation between the different clinical forms and the ACT genotype or allelic frequencies. These data suggest that the ACT gene does not exert any influence on the clinical expression of PD.

No ACT genotype differences were found between PD patients and control subjects regarding age. However, we observed that the ACT-AA genotype was more predominant in subjects who

were ≤ 50 years old in the PD and control groups. This finding may suggest an association of the ACT-AA genotype with other pathologic conditions, different from PD, that shorten the life span. Genetic defects in ACT have been reported to be associated with lung and liver diseases.²⁵

To our knowledge, except for the α -1-synuclein and parkin mutations described in a few families, there is not a single genetic polymorphism that has been confirmed to be a risk factor for developing PD. Thus, susceptibility to developing PD in either familial or sporadic patients has failed to be related to some gene polymorphisms such as tyrosine hydroxylase, monoamine oxidase A (MAO-A), and MAO-B.²⁶⁻²⁸ Recent molecular genetic studies²⁹ of the debrisoquine hydroxylase gene (CYP2D6) in patients with PD have indicated that the frequency of the mutations was only slightly enhanced after age at onset of 60 years. In contrast to the results from studies conducted among patients with an older age at onset, there were no significant differences in CYP2D6 allelic frequencies between young-onset PD patients and control subjects.³⁰ Moreover, the absence of differences in the distribution of CYP2D6 genotypes between sibling pairs concordant or discordant for PD, together with the results of a linkage analysis exclusively with affected family members that yielded negative lod scores, argue against the CYP2D6 locus being a major determinant of genetic susceptibility in familial PD.²⁹ Looking for other genetic susceptibility factors for PD is now important because it may be helpful in the identification of subjects at risk, and may lead to the design of more specific preventive or curative therapies.

Acknowledgments

Supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 96/0658) to R.O. and from the Generalitat de Catalunya (SGR1996–00064; CIRIT).

The authors acknowledge the clinical assistance provided by Mercè Francés.

References

1. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease : a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181–184.[Abstract]
2. Wong GF, Gray CS, Hassanein RS, Koller WC. Environmental risk factors in siblings with Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1991;48:287–289.[Medline]
3. Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, et al. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease : a case-control study in Germany. *Neurology* 1996;46:1275–1284.[Abstract]
4. De Michele G, Filla A, Volpe G, et al. Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease : a case-control study in southern Italy. *Mov Disord* 1996;11:17–23.[Medline]
5. Lazzarini AM, Myers RH, Zimmerman TR Jr, et al. A clinical genetic study of Parkinson's disease : evidence for dominant transmission. *Neurology* 1994;44:499–506.[Abstract]
6. Maraganore DM, Harding AE, Marsden CD. A clinical and genetic study of familial Parkinson's disease. *Mov Disord* 1991;6:205–211.[Medline]
7. Markopoulou K, Wszolek ZK, Pfeiffer RF. A Greek–American kindred with autosomal dominant, levodopa-responsive parkinsonism and anticipation. *Ann Neurol* 1995;38:373–

378.[Medline]

- 8.Planté-Bordeneuve V, Taussig D, Thomas F, Ziegler M, Said G. A clinical and genetic study of familial cases of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1995;133:164–172.[Medline]
- 9.Bonifati V, Fabrizio E, Vanacore N, De Mari M, Meco G. Familial Parkinson's disease : a clinical genetic analysis. *Can J Neurol Sci* 1995;22:272–279.[Medline]
- 10.Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the <Imagen: {alpha}>-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045–2047.[Abstract/Full Text]
- 11.Krüger R, Kuhn W, Müller T, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding <Imagen: {alpha}>-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18:106–108.[Medline]
- 12.Muñoz E, Oliva R, Obach V, et al. Identification of Spanish familial Parkinson's disease and screening for the Ala53Thr mutation of the <Imagen: {alpha}>-synuclein gene in early onset patients. *Neurosci Lett* 1997;235:57–60.[Medline]
- 13.Yamamoto M, Kondo I, Ogawa N, Asanuma M, Yamashita Y, Mizuno Y. Genetic association between susceptibility to Parkinson's disease and <Imagen: {alpha}>1-antichymotrypsin polymorphism. *Brain Res* 1997;759:153–155.[Medline]
- 14.Marder K, Tang MX, Mejia H, et al. Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives : a community-based study. *Neurology* 1996;47:155–160.[Abstract]
- 15.Weiner WJ, Lang AE. Rating scales for movement disorders. In: Weiner WJ, Lang AE, eds. *Movement disorders: a comprehensive survey*. New York:Futura Publishing, 1989:687–725.
- 16.Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by <Imagen: {alpha}>1-antichymotrypsin polymorphism. *Nat Genet* 1995;10:486–488.[Medline]
- 17.Byth BC, Billingsley GD, Cox DW. Physical and genetic mapping of the serpin gene cluster

at 14q32.1 : allelic association and a unique haplotype associated with α -1-antitrypsin deficiency. *Am J Hum Genet* 1994;55:126–133.[Medline]

18.Rozemuller JM, Abbink JJ, Kamp AM, Stam FC, Hack LE, Eikelenboom P. Distribution pattern and functional state of α -1-antichymotrypsin in plaques and vascular amyloid in Alzheimer's disease. A immunohistochemical study with monoclonal antibodies against native and inactivated alpha 1-antichymotrypsin. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991;82:200–207.[Medline]

19.Muramatsu T, Matsushita S, Arai H, Sasaki H, Higuchi S. α -1-Antichymotrypsin gene polymorphism and risk from Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1996;103:1205–1210.[Medline]

20.Ezquerra M, Blesa R, Tolosa E, Ballesta F, Oliva R. α -1-Antichymotrypsin gene polymorphism and risk for Alzheimer's disease in the Spanish population. *Neurosci Lett* 1998;240:107–109.[Medline]

21.Murphy GM Jr, Sullivan EV, Gallagher-Thompson D, et al. No association between the α -1-antichymotrypsin A allele and Alzheimer's disease. *Neurology* 1997;48:1313–1316.[Abstract]

22.Muller U, Bodeker RH, Gerundt I, Kurz A. Lack of association between α -1-antichymotrypsin polymorphism, Alzheimer's disease and allele epsilon 4 of apolipoprotein E. *Neurology* 1996;47:1575–1577.[Abstract]

23.De Rijk MC, Breteler MMB, Graveland GA, et al. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly : the Rotterdam Study. *Neurology* 1995;45:2143–2146.[Abstract]

24.Morgante L, Rocca WA, Di Rosa AE, et al. Prevalence of Parkinson's disease and other types of parkinsonism : a door-to-door survey in three Sicilian municipalities. *Neurology* 1992;42:1901–1907.[Abstract]

25. Poller W, Faber JP, Weidinger S, et al. A leucine-to-proline substitution causes a defective α -1-antichymotrypsin allele associated with familial obstructive lung disease. *Genomics* 1993;17:740–743.[Medline]
26. Planté-Bordeneuve V, Davis MB, Maraganore DM, Marsden CD, Harding AE. Tyrosine hydroxylase polymorphism in familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* 1994;9:337–339.[Medline]
27. Planté-Bordeneuve V, Taussig D, Thomas F, et al. Evaluation of four candidate genes encoding proteins of the dopamine pathway in familial and sporadic Parkinson's disease : evidence for association of a DRD2 allele. *Neurology* 1997;48:1589–1593.[Abstract]
28. Ho SL, Kapadi AL, Ramsden DB, Williams AC. An allelic association study of monoamine oxidase B in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1995;37:403–405.[Medline]
29. Planté-Bordeneuve V, Davis MB, Maraganore DM, Marsden CD, Harding AE. Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism in familial Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994;57:911–913.[Abstract]
30. Sandy MS, Armstrong M, Tanner CM, et al. CYP2D6 allelic frequencies in young-onset Parkinson's disease. *Neurology* 1996;47:225–230.[Abstract]

**TRABAJO 2: DOPAMINE RECEPTOR D2 INTRONIC POLYMORPHISM
IN PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE**

Neuroscience Letters

Volume 273, Issue 3

8 October 1999

Pages 151-154

Dopamine receptor D2 intronic polymorphism in patients with Parkinson's disease

Pau Pastor(a), Esteban Muñoz(a), Victor Obach(a), María José Martí(a), Rafael Blesa(b), Rafael Oliva (c), and Eduardo Tolosa(a)

(a) Parkinson's disease and Movement Disorders Unit, Neurology Service, Hospital Clínic Universitari, Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

(b) Neurology Service, Hospital Clínic Universitari, IDIBAPS, Barcelona, Spain

(c) Genetics Service, Hospital Clínic Universitari and Human Genome Research Group, Faculty of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

Abstract

An association between the intronic allele 3 of the dopamine receptor D2 (DRD2) gene and European Parkinson's disease (PD) cases has been reported recently. We initiated the present work in order to determine whether this association between the DRD2 locus and PD is also present in our population from Spain. The DRD2 gene polymorphism has been genotyped in

154 patients and in 125 controls. The allele 3 is present in 60.3% of the patients and in 55.2% of the controls. The genotype 3/3 is present in 36.3% of the patients and in 34.4% of the controls. No statistical differences in the genotype and allelic frequencies between the two groups have been found. No differences were also found when the patients were classified according to different criteria such as onset, family history, gender or clinical presentation. Thus our results do not support a role for the DRD2 locus to develop PD.

Author Keywords: Parkinson's disease; Dopamine receptor D2; Genetics; Spanish

Parkinson's disease (PD) is the second neurodegenerative disorder in frequency after Alzheimer's disease. The relation of PD with some genes such as tyrosine hydroxylase [5], monoamine oxidase A and B [12 and 19], debrisoquine hydroxylase [1, 13 and 18], superoxide dismutase [2 and 17], or α 1-antichymotrypsin [22] has been investigated, but the results obtained from different studies are contradictory [3 and 15]. However, mutations in the α -synuclein and parkin genes have been proved to be a cause of a few cases of familial PD [20] and of autosomal recessive juvenile parkinsonism [11], respectively.

An association between the dopamine receptor D2 allele 3 and increased risk to develop PD has been recently reported in European PD patients [19]. Therefore, we decided to undertake the present work in order to investigate whether the DRD2 intronic polymorphism was also associated to an increased risk for developing PD in our population.

We selected 154 patients (68 women and 86 men; mean age: 56 ± 11 years) diagnosed as having

clinically definite PD following the UK Parkinson's Disease Society Brain Bank diagnosis criteria [6]. Forty-seven patients had a positive familial history for PD and in 94 cases the disease was sporadic, while in 13 cases it was doubtful. Familial PD was diagnosed using the criteria proposed by Marder and cols. [14]. The clinical presentation of PD was classified as rigid-akinetic, tremoric and mixed type when tremor and rigidity were present in the same patient.

The control group (mean age: 58 ± 12 years) corresponded to spouses of the patients ($n=75$) and healthy blood donors ($n=50$). None of the 125 healthy control subjects (71 women and 54 men) had clinical evidence of neurological disease or familial history of parkinsonism. All the individuals were recruited, after informed consent, from the Hospital Clínic of Barcelona. This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínic.

A TG/CA repeat polymorphism in the second intron of the DRD2 locus was detected through amplification of an 80–86-base pair (bp) fragment using the conditions previously reported [9]. The sizes of the allelic fragments (bp) were 80 bp for allele 1, 82 bp for allele 2, 84 bp for allele 3, 86 bp for allele 4 (Fig. 1). Statistical assessments were made using the chi-square analysis with the Yates' correction for 2×2 tables from the SSPS 6.1 Statistical Package (SSPS Inc. Chicago, IL).

Fig. 1. Silver stained polyacrilimide gel electrophoresis of the DRD2 intronic polymorphism present in PD patients and in controls. Each lane corresponds to a different individual and the corresponding genotypes are indicated bellow. The size of the different PCR amplification fragments corresponding to the alleles shown is indicated in base pairs (bp).

The highest allelic frequency corresponds to the allele 3 which is present in 60.3% of PD patients and in 55.2% of the controls. The genotype 3/3 is the most frequent genotype in both groups since it is found in 36.3% of the PD cases and in 34.4% of the controls. However, these differences are not significant.

No statistical differences have been detected in the genotype 3/3 or in the allele 3 frequency between PD patients with an onset of the disease earlier than 50 years and those with an onset older than 50. No differences were detected either in the allelic frequencies in familial PD cases as compared with those presents in sporadic cases, neither between males and females or among the different clinical subtypes of PD (Table 1).

Table 1. DRD2 genotypes and allelic frequencies in control subjects and in Parkinson's disease (PD) patients stratified according to different criteria

The D2 receptor is localized mainly in the pars compacta of the substantia nigra and in the neostriatum and is considered the target for nigrostriatal dopaminergic neurons controlling motor function in PD [8]. The D2 receptor is thought to be the site of action of most antiparkinsonian drugs. The DRD2 gene has been cloned and mapped to chromosome 11q22-q23 [7] and several polymorphisms have been described [9].

An increased DRD2 intronic allele 3 frequency in British and French sporadic and familial PD cases has been recently reported [19]. Individuals who were homozygous for the allele 3 were 2.3 times more frequent in sporadic PD patients as compared with control subjects. However, in contrast with this finding, we have not found such an association in our population. It is noteworthy to point out that in our study the allele 3 frequency in sporadic PD patients was similar to that found in the British-French study (60.7% in our study vs. 59.5%). However, the allele 3 frequency in the control group was significantly higher in our study (55.2 vs. 44.5%; $P < 0.05$). These differences are likely to be due to the different genetic background of the respective populations. The lack of detection of a significant association in our study is not attributable to a limited sample since, in fact, we have included nearly twice the number of individuals in both groups as compared with the British-French study. Thus, our study reaches a higher statistical power.

We have not detected either any significant differences in the allelic or genotype frequencies when the age at onset of PD was analyzed. Thus, PD patients younger than 50 years had an allele 3 frequency similar to those of patients older than 50, suggesting that the presence of this allele does not have any influence in the age at onset of PD. The DRD2 allele distribution was also similar in familial and sporadic PD cases. Therefore, this finding argues definitely against a hypothetical genetic influence of DRD2 in our PD cases because, if this was true, a familial clustering for a specific genotype may have been expected in familial PD cases.

Other investigators have also failed to demonstrate a correlation between the DRD2 gene polymorphisms and PD in different populations. No association was detected between the

presence of the DRD2 gene polymorphism and the risk to develop PD in an small sample of individuals when genotyped using Taq I restriction polymorphism [4]. No differences were detected either in the Japanese population when 71 PD patients were compared with 90 healthy control subjects [16]. Other dopamine receptors have been also investigated. No association has been found between polymorphisms present at the dopamine receptors D3 and D4 (DRD4) and increased risk to develop PD [10]. However, in a recent study an association of long variants, consisting in six repeats or more, of the DRD4 exon 3 polymorphism and PD has been reported [21].

Thus, while our study contributes to rule out any involvement of the polymorphism present at the DRD2 gene in PD, the possibility is now open to test whether other genes in the dopamine receptor family could confer susceptibility to PD in our population.

<Imagen>

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Hospital Clínic Universitari (Barcelona) to P.P. and Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 96/0658) and Generalitat de Catalunya (1997 SGR-00769) to R.O. The authors acknowledge the clinical assistance provided by Mercè Francés.

<Imagen>

References

1. M. Amstrong, A.K. Daly, S. Cholerton, D.N. Bateman and J.R. Idle, Mutant debrisoquine hydroxylase genes in Parkinson's disease. *Lancet* 339 (1992), pp. 1017- 1018.

2. O. Bandmann, M.B. Davis, C.D. Marsden and A.E. Harding, Sequence of the superoxide dismutase 1 (SOD 1) gene in familial Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 59 (1995), pp. 90- 91. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-BIOTECHNOBASE](#) | [Abstract](#) | [Abstract-Elsevier BIOBASE](#)

3. O. Bandmann, C.D. Marsden and N.W. Wood, Genetic aspects of Parkinson's disease. *Movement Disorders* 13 (1998), pp. 203- 211. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#)

4. D.E. Comings, B.G. Comings, D. Muhleman, G. Dietz, B. Shahbahrami, D. Tast, C. Knell, P. Kocsis, R. Baumgarten, B.W. Kovacs, D.L. Levy, M. Smith, R.L. Borison, D. Evans, L.M. Klein, J. MacMurray, J.M. Tosk, G. Sverd, R. Gysin and S.D. Flanagan, The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatry disorders. *J. Am. Med. Assoc.* 266 (1991), pp. 1793- 1800. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#)

5. T. Gasser, Z.K. Wszolek, J. Trofatter, B.S. Ozelius, R.J. Uitti, C.S. Lee, J. Gusella, R.F. Pfeiffer, D.B. Calne and X.O. Breakefield, Genetic linkage studies in autosomal dominant parkinsonism: evaluation on seven candidate genes. *Ann. Neurol.* 36 (1994), pp. 387- 396. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract](#) | [Abstract-BIOTECHNOBASE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-Elsevier BIOBASE](#)

6. W.R.G. Gibb and A.J. Lees, The relevance of Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 51 (1988), pp. 745-752. Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE

7. D.K. Grandy, M. Litt, L. Aleen, J.R. Bunzow, M. Marchionni, H. Makam, L. Reed, R.E. Magenis and O. Civelli, The human dopamine receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RPLF. *Am. J. Hum. Genet.* 45 (1989), pp. 778-785. Abstract-MEDLINE

8. M. Guttman, Dopamine receptors in Parkinson's disease. *Neurol. Clin.* 10 (1992), pp. 377-386. Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE

9. X.Y. Hauge, D.K. Grandy, J.H. Eubanks, G.A. Evans, O. Civelli and M. Litt, Detection and characterisation of additional DNA polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene. *Genomics* 10 (1991), pp. 527-530. Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE | Abstract-BIOTECHNOBASE

10. S. Higuchi, T. Muramatsu, H. Arai, M. Hayashida, H. Sasaki and J.Q. Trojanowski, Polymorphisms of dopamine receptor and transporter genes and Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 10 (1995), pp. 107-113. Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE | Abstract | Abstract-Elsevier BIOBASE

11. T. Kitada, S. Asakava, T. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokichi, Y. Mizuno and N. Shimizu, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile

parkinsonism. *Nature* 392 9 (1998), pp. 544-547.

12. J.H. Kurth, M.C. Kurth, S.E. Poduslo and J.D. Schwankhaus, Association of monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 33 (1993), pp. 368-372. Abstract-MEDLINE | Abstract-BIOTECHNOBASE | Abstract-EMBASE

13. G. Lucotte, J.C. Turpin, N. Gerard, S. Panserat and R. Krishnamoorthy, Mutation frequencies of the cytochrome CYP2D6 gene in Parkinson disease patients and in families. *Am. J. Med. Genet.* 67 (1996), pp. 361-365. Abstract-MEDLINE | Abstract | Abstract-BIOTECHNOBASE | Full-text via CrossRef

14. K. Marder, M.X. Tang, H. Mejia, B.A. Alfaro, L. Coté, E. Louis, J. Groves and R. Mayeux, Risk of Parkinson's disease among first degree relatives: a community-based study. *Neurology* 47 (1996), pp. 155-160. Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE | Abstract

15. E. Muñoz, V. Obach, R. Oliva, M.J. Martí, M. Ezquerra, P. Pastor, F. Ballesta and E. Tolosa E, <Imagen>1-Antichymotrypsin gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Neurology* 52 (1999), pp. 297-301.

16. S. Nanko, A. Ueki, M. Hattori, X.Y. Dai, T. Sasaki, R. Fukuda, K. Ikeda and H. Kazamatsuri, No allelic association between Parkinson's disease and dopamine D2, D3 and D4 receptor gene polymorphisms. *Am. J. Med. Genet.* 54 (1994), pp. 361-364. Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE | Abstract

17. J.S. Parboosingh, M. Rousseau, F. Rogan, Z. Amit, H. Chertkow, W.G. Johnson, F. Manganaro, H.N. Schipper, T.J. Curran, J. Stoessl and G.A. Rouleau, Absence of mutations in superoxide dismutase and catalase genes in patients with Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 52 (1995), pp. 1160-1163. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#)
18. V. Plante-Bordeneuve, M.B. Davis, D.M. Maraganore, C.D. Marsden and A.E. Harding, Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism in familial Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57 (1994), pp. 911-913. [Abstract](#) | [Abstract-BIOTECHNOBASE](#) | [Abstract-EMBASE](#)
19. V. Planté -Bordeneuve, D. Taussig, F. Thomas, G. Said, N.W. Wood, C.D. Marsden and A.E. Harding, Evaluation of four candidate genes encoding proteins of the dopamine pathway in familial and sporadic Parkinson's disease: evidence of association of a DRD2 allele 48. *Neurology* 48 (1997), pp. 1589-1593. [Abstract-BIOTECHNOBASE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#)
20. M.H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, G. Di Iorio, L.I. Golbe and R.L. Nussbaum, Mutation in α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276 (1997), pp. 2045-2047. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Full-text via CrossRef](#)
21. M.H. Ricketts, R.M. Hamer, P. Manowitz, F. Feng, J.I. Sage, R. Di Paola and M.A. Menza, Association of long variants of the dopamine D4 receptor exon 3 repeat polymorphism with Parkinson's disease. *Clin. Genet.* 54 (1998), p. 33. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-](#)

22. M. Yamamoto, I. Kondo, N. Ogawa, M. Anasuma, Y. Yamashita and Y. Mizuno, Genetic association between susceptibility to Parkinson's disease and α 1-antichymotrypsin polymorphism. *Brain Res.* 759 (1997), pp. 153-155. [SummaryPlus](#) | [Article](#) | [Journal Format-PDF \(76 K\)](#)

**TRABAJO 3. IDENTIFICATION OF SPANISH FAMILIAL
PARKINSON'S DISEASE AND SCREENING FOR THE
Ala53Thr MUTATION OF THE α -SYNUCLEIN GENE IN
EARLY ONSET CASES**

Neuroscience Letters

Volume 235, Issues 1-2

10 October 1997

Pages 57-60

Identification of Spanish familial Parkinson's disease and screening for the Ala53Thr mutation of the α -synuclein gene in early onset patients

Esteban Muñoz(a), Rafael Oliva(b), Victor Obach(a), María J. Martí(a), Pau Pastor(a), Francisca Ballesta(b) and Eduardo Tolosa(a)

(a) Neurology Service, Hospital Clínic i Provincial, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

(b) Genetics Service, Hospital Clínic i Provincial, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

Abstract

We initiated the present work in order to determine if the Ala53Thr mutation of the α -synuclein gene previously described by Polymeropoulos et al. [Science, 276 (1997) 2045-2047] could be detected in Spanish early onset Parkinson's disease (PD) patients. Thirty-four PD patients were evaluated. Of these, 13 were considered early onset patients (six familial and seven sporadic) and were included in the genetic study. We detected

the presence of genetic anticipation in four kindreds with early onset PD members. The Ala53Thr mutation of the α -synuclein gene was absent in all patients. The results do not support a role for this mutation in our patients with early onset PD and, in agreement with the results previously reported, indicate that the Ala53Thr mutation of the α -synuclein gene is a rare cause of PD.

Author Keywords: Parkinson's disease; α -Synuclein; Genetics; Chromosome 4; Early onset

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder clinically characterised by resting tremor, muscular rigidity, bradykinesia, progressive gait disorder and stooped posture. Although evidence for the existence of genetic susceptibility in PD had been extensively documented [2, 3, 6, 7, 9, 11, 14, 15], the gene or genes responsible for this susceptibility had remained elusive so far. Recently a significant linkage of PD to markers in 4q21-q23 has been reported in a large kindred of Italian descent with pathologically confirmed PD [12]. Subsequently, the same authors have identified a mutation (Ala53Thr) in the α -synuclein gene as responsible for PD in this family and in three Greek kindreds [13]. In these families the mean age of onset for the disease was relatively early (<50 years).

We initiated the present work in order to determine if the Ala53Thr mutation of the α -synuclein gene could be detected in the Spanish familial or sporadic PD patients. We arbitrarily considered early onset PD when the age of onset was less than 50 years in

order to study a population with an age similar to that described by Polymeropoulos et al. [12, 13]. All patients included in the study were diagnosed as clinical definite PD based on the Parkinson's disease society brain bank diagnosis criteria [5]. Diagnosis of familial PD was made using similar criteria to those used by Marder et al. [7]. Blood samples were obtained after informed consent. Leukocytes were prepared from fresh blood using Histopake 1119 (Sigma) and subsequently DNA was isolated through proteinase K digestion, chloroform extraction and ethanol precipitation.

Thirty-four patients were initially included (19 familial, 15 sporadic). We identified 13 patients with early onset PD. Of these patients, six were familial and seven sporadic PD. Unpaired t-test showed no significant differences between familial and sporadic patients regarding the age of onset, duration of the illness at the time of the analysis, sex, type of parkinsonism and the unified PD rating scale, the Hoehn and Yahr stage and the Schwab and England scores (Table 1). These results are in agreement with those described by other investigators who did not find clinical differences between familial and sporadic PD patients [11]. The structure of some of the pedigrees with relatively early onset PD members (Fig. 1) clearly points to an autosomal dominant pattern of inheritance. We have found that the mean age of onset is higher in parents (74 ± 3.9 years) than in the respective children (41 ± 4.2 years) ($P=0.0001$). This finding is consistent with the existence of genetic anticipation in our families. A similar anticipation phenomenon has been previously reported [8, 10, 11]. Genetic anticipation could point to the presence of expansion of repeated sequences in the genome as has been shown for other neurological disorders [1].

Table 1. Clinical features of the patients with Parkinson's disease included in the present study

Fig. 1. (A–F) Structure of the pedigrees of the familial PD patients with early onset affected members. The numbers below the pedigree symbol indicate the actual age or the age of death and the numbers between parenthesis mean the age of onset of the affected members.

Based on the described age of onset of PD in the families with the α -synuclein gene mutation [13], we selected the 13 early onset PD patients for mutation screening. We also included sporadic early onset patients in the genetic study because these patients were clinically undistinguishable from those with familial history (Table 1). DNA was amplified using the primers and conditions previously described [13]. Subsequently the PCR product was incubated with the restriction enzyme Tsp45 I (NEBiolabs) for 1 h at 65°C and analysed by agarose gel electrophoresis, visualised after ethidium bromide staining and photographed. α -DNA was used as a positive control for Tsp45 I digestion. The results did not support the presence of the Ala53Thr mutation of the α -synuclein gene in the samples analysed (Fig. 2) and are in agreement with those of Polymeropoulos et al. [13] which suggest that the Ala53Thr mutation of the α -synuclein gene is a rare cause of

PD. As indicated by Golbe et al. [3, 4], patients of the Italian kindred with the <Imagen>-synuclein gene mutation [13] present atypical features of PD such as a relatively early onset age and a rapid illness with a mean course to death of 9 years. We suggest that the Ala53Thr mutation of the <Imagen>-synuclein could be selective for this 'malignant' form of PD, but to ascertain this question more extensive studies are necessary. The possibility to determine whether the mutations responsible for our familial patients are due to other potential changes in the <Imagen>-synuclein gene, or instead they cosegregate or are associated with other loci is now open to study.

Fig. 2. PCR and restriction enzyme analysis of the fourth exon of the <Imagen>-synuclein gene in early-onset PD patients showing the absence of the Ala53Thr mutation. Lanes 1-8, Samples from independent patients amplified by PCR and digested with Tsp45 I. Lane 9, <Imagen>-DNA control digested with Tsp45 I. Lane 10, Undigested <Imagen>-DNA control. Lane 11, 1 kb size Gibco-BRL markers. The PCR amplified and Tsp45 I treated product is indicated with an arrow.

Acknowledgements

This work has been supported by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS 96/0658. We acknowledge clinical assistance provided by Mercè Francés.

References

1. C.T. Ashley, Jr. and S.T. Warren, Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annu. Rev. Genet.* 29 (1995), pp. 703-728. Abstract-MEDLINE | Abstract-BIOTECHNOBASE | Abstract-Elsevier BIOBASE
2. V. Bonifati, E. Fabrizio, N. Vanacore, M. De Mari and G. Meco, Familial Parkinson's disease: a clinical genetic analysis. *Can. J. Neurol. Sci.* 22 (1995), pp. 272-279. Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE | Abstract
3. L.I. Golbe, G. Di Iorio, V. Bonavita, D.C. Miller and R.C. Duvoisin, A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 27 (1990), pp. 276-282. Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE
4. L.I. Golbe, G. Di Iorio, G. Sanges, A.M. Lazzarini, S. La Sala, V. Bonavita and R.C. Duvoisin, Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. *Ann. Neurol.* 40 (1996), pp. 767-775. Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE | Abstract | Abstract-Elsevier BIOBASE
5. A.J. Hughes, S.E. Daniel, L. Kilford and A.J. Lees, Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55 (1992), pp. 181-184. Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE
6. A.M. Lazzarini, R.H. Myers, T.R. Zimmerman, M.H. Mark, L.I. Golbe, J.I. Sage, W.G.

Johnson and R.C. Duvoisin, A clinical genetic study of Parkinson's disease: evidence for dominant transmission. *Neurology* 44 (1994), pp. 499- 506. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#) | [Abstract-Elsevier BIOBASE](#)

7. K. Marder, M.X. Tang, H. Mejia, B.A. Alfaro, L. Côté, E. Louis, J. Groves and R. Mayeaux, Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: a community based study. *Neurology* 47 (1996), pp. 155- 160. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#)

8. K. Markopoulou, Z.K. Wszolek and R.F. Pfeiffer, A Greek-American kindred with autosomal dominant, levodopa-responsive parkinsonism and anticipation. *Ann. Neurol.* 38 (1995), pp. 373- 378. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#)

9. H. Payami, K. Larsen, S. Bernerd and J. Nutt, Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. *Ann. Neurol.* 36 (1994), pp. 659- 661. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#)

10. H. Payami, S. Bernard, K. Larsen, J. Kaye and J. Nutt, Genetic anticipation in Parkinson's disease. *Neurology* 45 (1995), pp. 135- 138. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-Elsevier BIOBASE](#)

11. V. Planté-Bordeneuve, D. Taussig, F. Thomas, M. Ziegler and G. Said, A clinical genetic study of familial cases of Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 133 (1995), pp. 164- 172. [Abstract](#) | [Journal Format-PDF \(568 K\)](#)

12. M.H. Polymeropoulos, J.J. Higgins, L.I. Golbe, W.G. Johnson, S.E. Ide, G. Di Iorio, G. Sanges, E.S. Stenroos, L.T. Pho, A.A. Schaffer, A.M. Lazzarini, R.L. Nussbaum and R.C. Duvoisin, Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 274 (1996), pp. 1197-1199. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract-BIOTECHNOBASE](#) | [Abstract-Elsevier BIOBASE](#) | [Full-text via CrossRef](#)
13. M.H. Polymeropoulos, C. Lavedan, E. Leroy, S.E. Ide, A. Dehejia, A. Dutra, B. Pike, H. Root, J. Rubenstein, R. Boyer, E.S. Stenroos, S. Chandrasekharappa, A. Athanassiadou, T. Papapetropoulos, W.G. Johnson, A.M. Lazzarini, R.C. Duvoisin, G. Di Iorio, L.I. Golbe and R.L. Nussbaum, Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276 (1997), pp. 2045-2047. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Full-text via CrossRef](#)
14. A. Seidler, W. Hellenbrand, B.P. Robbra, P. Vieregge, P. Nischan, J. Joerg, W.H. Oertel, G. Ulm and E. Schneider, Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease. *Neurology* 46 (1996), pp. 1275-1284. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#)
15. C.H. Waters and C.A. Miller, Autosomal dominant lewy body parkinsonism in a four-generation family. *Ann. Neurol.* 35 (1994), pp. 59-64. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract](#) | [Abstract-EMBASE](#)

**TRABAJO 4. ANALYSIS OF THE CODING AND 5' FLANKING
REGIONS OF THE α -SYNUCLEIN GENE IN PATIENTS
WITH PARKINSON'S DISEASE.**

Analysis of the coding and the 5' flanking regions of the α -synuclein gene in patients with Parkinson's disease (Mov Disord, en prensa)

Pau Pastor, MD, Esteban Muñoz, MD, *Mario Ezquerra, PhD, †Victor Obach, MD, María José Martí, MD, PhD, Francesc Valldeoriola, MD, Eduard Tolosa, MD, PhD, *Rafael Oliva, MD, PhD.

Parkinson's Disease and Movement Disorders Unit, Neurology Service, Institut Clínic de Malalties del Sistema Nerviós, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain; *Genetics Service, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain and †Neurology Service, ICMSN, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain.

Summary: Missense mutations of the α -synuclein gene have been reported to explain a few kindreds with autosomal dominant Parkinson's disease (PD). In order to identify mutations in our PD patients we have screened the coding region and 5' flanking region of the gene. DNA samples from 50 patients with familial PD were screened via single-strand conformation polymorphism (SSCP) for mutations in the α -synuclein gene. The 5' flanking region was examined in other 117 additional PD patients (27 patients with unclear family history for PD, and 90 patients without family history) and in 169 control subjects. We found one change (G199A) in exon 4 in one family with a pattern of autosomal dominant PD. However, this mutation did not result in an aminoacid substitution (valine) and did not segregate completely with PD. The analysis of the 5' flanking region also showed a new polymorphism, a nucleotide insertion (-164insA) linked to a nucleotide substitution (C-116G), in patients and in controls. The -164insA/C-116G allele was present in 52.3% of the patients and in 47.6% of the controls. We did not find significant differences regarding the allelic and genotype

frequencies between PD and control groups. These results suggest that mutations in the α -synuclein gene are a very rare cause of familial PD and that the novel -164insA/C-116G polymorphism in the 5' flanking region does not confer susceptibility to develop PD.

Key words: Parkinson's disease-Genetics- α -synuclein

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that affects 1-2% of the population over the age of 60. Pathological studies have shown neuronal degeneration which affects predominantly the dopaminergic nerve cells of the substantia nigra in the brain. The surviving cells contain characteristic cytoplasmic inclusions known as Lewy bodies (LB). Neurofilaments and ubiquitin are present in LB, but their biochemical composition remains unknown yet.

There are increasing evidences that genetic and environmental factors could play an important role in the aetiology of PD. A few years ago, genetic molecular studies¹ identified the first mutation associated to familial PD in an Italian kindred and in other 3 unrelated Greek PD families. The mutation consisted in a guanine to adenine transition at position 209 (G209A), in the exon 4 of the α -synuclein gene, that resulted in alanine to threonine substitution at codon 53 (A53T). Since then, other new 9 Greek families with an autosomal dominant PD have been described carrying this mutation.^{2,3} A second mutation in the α -synuclein gene, consisting in a G88C transition that caused an A30P substitution has been describe in a German family with PD.⁴

The α -synuclein protein is involved in the vesicle function via lipid binding at the presynaptic terminal.⁵ LB stain strongly with antibodies for α -synuclein in idiopathic PD, pointing out that this presynaptic protein may have an important role in the pathogenesis of PD.⁶

In the present work, we analysed the coding and 5' flanking regions of the α -synuclein gene in a large PD series to identify changes associated with familial and/or sporadic PD.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects

PD patients were recruited from the Movement Disorders Unit of the Hospital Clínic (Barcelona) from May 1996 to July 2000. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínic Universitari of Barcelona. All patients followed UK Parkinson Disease Society Brain

Bank criteria for definite clinical PD except for the exclusion criteria of familial disorder.⁷ We considered the diagnosis of familial PD when, one or more, first or second-degree, relative were affected from the disease. Fifty unrelated PD cases fulfilling the criteria for definite or probable familial PD proposed by Marder et al⁸ were classified as familial PD. Twenty-seven patients with doubtful or uncertain family history for PD⁸ were classified as unclear familial cases. Additionally, samples from 90 patients with sporadic PD and 169 healthy controls, without family history of PD or tremor, were obtained. No significant differences there were between the age at onset of PD (mean: 56.65±11 years) and the current age of the control group (mean: 58±12 years). Blood samples were drawn after informed consent was obtained.

Methods

Genotyping of the coding region of the α -synuclein gene: DNA was obtained using standard methods. All exons were amplified using the primers and PCR conditions described.^{1,9} In order to detect genetic variations, PCR samples were electrophoresed in two different SSCP conditions¹⁰ varying the acrylamide gel concentration and temperature (7%/22°C and 12%/6°C).

Analysis of the 5' flanking α -synuclein gene: We designed two oligonucleotides for the specific PCR amplification of a fragment (334bp long, containing a part of the 5' flanking region of the α -synuclein gene, from -298 to +36 nucleotide, in reference to the first nucleotide of the exon 1-2, GenBank accession number: U46896). The sequence of the designed primers was: 5'-CAAGAGTGCGTGACCC-3' (forward) and 5'-AGCCCGCACGCACCTCACTTCC-3' (reverse). PCR was performed in a total volume of 25 μ l containing 11.05 μ l H₂O, 2.5 μ l of appropriate buffer, 4 μ l of dNTP 1.25 mM, 1 μ l of each primer, 1 μ l of Cl₂Mg 25 mM, 0.2 U of *Taq* polimerase, 1.25 μ l of DMSO and 120 ng of genomic DNA. PCR was performed at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles at 94°C for 40 seconds, 62°C for 40 seconds, 72°C for 60 seconds, and a final extension at 72°C for 10 min. SSCP analysis were carried out denaturing the PCR products at 94°C for 10 min in

the appropriate buffer, cooled on ice for 1 min and electrophoresed in a 7% polyacrilamide (0.5xTBE) gel at 400 V for 3 h 30 min. After electrophoresis, the gel was silver stained as described previously.¹¹ When an abnormal SSCP pattern was observed, the samples were sequenced using the Dye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction (Perkin Elmer) and run on a ABI-prism automatic DNA Sequencer (Perkin Elmer).

Statistical analysis: The results were compared between the control and PD groups and between the familial and sporadic PD cases using the chi-square analysis from the SSPS 6.1 Statistical Package (SSPS Inc. Chicago).

RESULTS

Analysis of the coding region of the α -synuclein gene

The screening of familial PD cases showed a change in the exon 4 consisting in a heterozygous nucleotide substitution (G199A) in a PD family with an autosomal dominant pattern of inheritance (figure 1). This change did not result in an aminoacid substitution (Valine) and did not segregate completely with the disease (figure 1), but it was absent in 98 chromosomes from patients with familial PD. Clinically, this family was characterized by a the presence of essential tremor in some members and a great variability of the onset of parkinsonian symptoms (range 52-80 years).

Analysis of the 5' flanking region of the α -synuclein gene

We detected by SSCP the presence of a band with a different mobility in some samples (fig.2A). Direct sequencing of the PCR products identified an adenine insertion at position -164 (-164insA) in reference to the first nucleotide of exon 1-2 (figure 2A). This change was always linked to a single base pair substitution from cytosine to guanine at position -116 (C-116G) (figure 2B)

resulting in a clear-cut pattern which was easy to interpret by SSCP. Therefore, SSCP was subsequently used for the genotyping of PD patients and controls subjects. The -164insA/C-116G change (allele G) was present in 52.3% of the patients and in 47.6% of the controls, but these differences did not reach statistical significance ($p=0.217$, $\chi^2=1.524$, $RR=1.21$). The genotype CC was detected in 22.8 % of PD patients and in 25.4 % of control subjects. The genotype CG was found in 49.7 % of PD group and in 53.8 % of the controls. The genotype GG was present in 27.5 % of PD group and in 20.7 % of the controls. These differences were not statistically significant between both groups ($p=0.338$, $\chi^2=2.158$, $RR:0.86$). No differences were found regarding either the allelic and genotype frequencies between sporadic and familial cases of PD (Table 1).

DISCUSSION

Our study identified a change (G199A) in the coding region of the α -synuclein gene in a large family with PD and essential tremor. The absence of the G199A variant in 98 chromosomes from other patients with familial PD, may indicate that the change detected could be a rare polymorphism. The G199A mutation does not segregate completely with the disease since two members who had the change did not suffer from PD, and one member with PD was not a carrier of the mutation. However, the onset of PD in this kindred is quite variable, suggesting that there may be some healthy members at risk for PD. Asymptomatic carriers older than the expected age at onset have been reported for the G209A α -synuclein mutation.³ This finding may respond to an incomplete penetrance of the mutation or to a modulation of the onset of PD by other unidentified factors. It has also been found that the G209A allelic expression is reduced in lymphoblastoid cell lines from individuals heterozygous for the mutation, suggesting that haploinsufficiency may underlie disease pathogenesis and that the dosage effects of this gene could be related to the different age at onset of the disease.¹² However, the pathogenicity of the G199A variation leading

to PD and/or essential tremor in this kindred appears to be a remote possibility since this change is not associated to an amino acid substitution.

In addition to the identification of the G199A variation, the analysis of the 5' flanking region of the α -synuclein gene led us to identify a new polymorphism consisting in a -164insA/C-116G change. After comparing the 5' region of the α -synuclein gene in the database TRANSFAC, searching potentially genetic regulatory factors in this sequence (available site at: <http://transfac.gbf-braunschweig.de/TRANSFAC/>), the -164insA variation occurs in the consensus sequence for a potential zinc-finger DNA-binding protein (Ik-2).¹³ This finding raises the possibility that the -164insA change could have some functional effect in the expression of the α -synuclein gene. However, the analysis of the allelic and genotype sequences of the frequencies 164insA/C-116G polymorphism in the present series do not support that this polymorphism is a risk factor for either sporadic or familial PD in our population (Table). Another polymorphism in the promoter region of the α -synuclein gene (NACP-Rep1) has been associated to an increased risk for PD.^{14,15} However, another study failed to replicate this association.¹⁶

We consider that SSCP method, used in two different conditions in our study, has a high sensitivity to detect mutations. In different studies this sensitivity varies from 84 to 100%^{17,18}. However, a low possibility that some sequence variants could have been missed still exists. The lack of clearly pathogenic mutations in the α -synuclein gene has also been reported in previous studies from other populations^{16,19-22} This results, together with the absence of association of the new 5' flanking region polymorphism found in this study suggest that mutations in the α -synuclein gene are a very rare cause of PD. Future studies in other candidate genes may shed new lights on the genetic factors involved in PD.

Acknowledgements

This work was supported by grants of the Hospital Clínic to P.P. and of Generalitat de Catalunya (1999SGR-000226) to R.O. The authors acknowledge the clinical assistance provided by Mercè Francés.

REFERENCES

1. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-2047.
2. Athanassiadou A, Voutsinas G, Psouri L, et al. Analysis of familial Parkinson's disease associated with α -synuclein G209A mutation. *Am J Hum Gen* 1998;63(suppl):137.
3. Papadimitriou A, Velezta V, Hadjigeorgiou GM, et al. Mutated α -synuclein gene in two Greek kindreds with familial PD: incomplete penetrance? *Neurology* 1999;52:651-654.
4. Krüger R, Kuhn W, Müller T, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding α -synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18:106-108.
5. Davison WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of α -synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem* 1998;273:9443-9449.
6. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, et al. α -synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388(28):839-840.
7. Gibb WRG, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:745-752.
8. Marder K, Tang MX, Mejia H, et al. Risk of Parkinson's disease among first degree relatives: a community-based study. *Neurology* 1996;47:155-160.
9. Farrer M, Wavrant-De Vrieze F, Crook R, et al. Low frequency of α -synuclein mutations in familial Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998;43:394-397.
10. Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM. 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimize single strand conformation polymorphism analyses. *Nucl Acids Res* 1993;21:3637-3642.
11. Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive staining of DNA in

- polyacrilamide gels. *Anal Biochem* 1991;196:80-83.
12. Markopolou K, Wszolek ZK, Pfeiffer RF, Chase BA. Reduced expression of the G209A α -synuclein allele in familial parkinsonism. *Ann Neurol* 1999;46:374-381.
 13. Molnar A, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA- binding proteins. *Mol Cell Biol* 1994;14:8292-8303.
 14. Krüger R, Vieira-Saecker AMM, Kuhn W, et al. Increased susceptibility to sporadic Parkinson's disease by a certain combined α -synuclein/Apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 1999;45:611-617.
 15. Tan EK, Matsura T, Nagasmitsu S, Khajavi BS, et al. Polymorphism of NACP-Rep1 in Parkinson's disease: An etiologic link with essential tremor?. *Neurology* 2000;54:1195-1198.
 16. Parsian S, Racette B, Zhang ZH, et al. Mutation, sequence, analysis and association studies of α -synuclein in Parkinson's disease. *Neurology* 1998;51:1757-1759.
 17. Ellis LA, Taylor CF, Taylor GR. A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HCPL for high throughput mutation scanning. *Human Mutation* 2000;15:556-564.
 18. Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, et al. SSCP analysis: A blind sensitive trial. *Human Mutation* 1997;10:65-70.
 19. Vaughan JR, Farrer MJ, Wszolek ZK, et al. Sequencing of the α -synuclein gene in a large series of cases of familial Parkinson's disease fails to reveal any further mutations. *Hum Mol Genet* 1998;7:751-753.
 20. Zarepari S, Kay J, Camicioli R, et al. Analysis of the α -synuclein G209A mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet* 1998;351:37-38.
 21. Wang WW, Khajavi M, Patel BJ, et al. The G209A mutation in the α -synuclein gene is not detected in familial cases of Parkinson's disease in non-Greek and/or Italian populations. *Arch Neurol* 1998;55:1521-1523.

22. Gasser T. Autosomal-dominantly inherited forms of Parkinson's disease. *J Neural*

Trasm 2000;58 (suppl):31-40.

Legends to the figures

FIG. 1. Pedigree of the PD kindred with the G199A change in the α -synuclein gene. The filled grey symbols indicate individuals affected from Parkinson's disease and the symbols filled with vertical lines indicate individuals affected from essential tremor. The numbers below each member denote the current age or the age of death and the age of onset of PD. The presence of the heterozygous G199A change is indicated with "+/-". The wild-type genotype is indicated with "-/-".

FIG. 2. Identification and characterization of the novel polymorphism (-164insA linked to C-116G) of the α -synuclein gene. (A) Single strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of the 5' flanking region in PD patients and in control subjects showing different genotypes. (B) Electropherograms of the sense strand showing wild type sequence (CC), and the -164insA/C-116G change (underlined) in its heterozygous (CG) and in the homozygous genotypes (GG).

TABLE. Distribution of genotype and allelic frequencies of the polymorphism in the 5'flanking region of the α -synuclein in Parkinson's disease (PD) and in controls.

	<i>Genotype frequencies</i>			<i>Allelic frequencies</i>	
	CC	CG	GG ^e	C	G ^f
PD patients (%) n=167	38 (22.8) ^a	83 (49.7) ^a	46 (27.5) ^a	159 (47.6) ^b	175 (52.3) ^b
Controls (%) n=169	43 (25.4) ^a	91 (53.8) ^a	35 (20.7) ^a	177 (52.3) ^b	161 (47.6) ^b
<i>PD familial status</i>					
Sporadic (%) n=90	20 (22.2) ^c	44 (48.9) ^c	26 (28.9) ^c	84 (46.6) ^d	96 (53.3) ^d
Familial (%) n=50	12 (24) ^c	24 (48) ^c	14 (28) ^c	48 (48) ^d	52 (52) ^d
Unclear (%) n=27	6 (22.2)	15 (55.5)	6 (22.2)	27 (50)	27 (50)

^a Comparison of genotypes between patients and controls: $\chi^2(2 \times 3) = 2.158$; $p = 0.338$. ^b

Comparison of allelic frequencies between PD and controls: $\chi^2(2 \times 2) = 1.524$, $p = 0.217$. ^c

Comparison of genotypes between sporadic and familial cases: $\chi^2(2 \times 3) = 0.0586$, $p = 0.961$. ^d

Comparison of alleles between sporadic and familial cases: $\chi^2(2 \times 3) = 0.008$ $p = 0.888$. ^eOdds Ratio (OR) for GG genotype=1.45. ^fOR for the G allele=1.21.

Figure 1

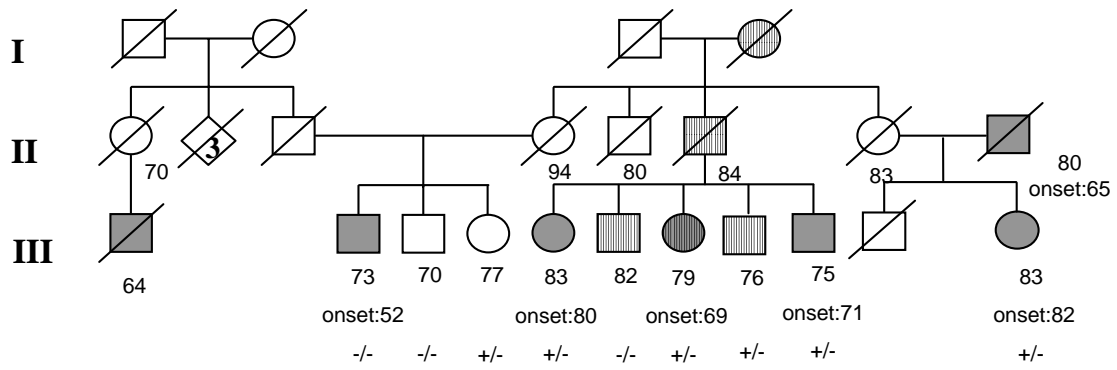


Figure 2

**TRABAJO 5. A NEW MUTATION IN THE PARKIN GENE IN A
PATIENT WITH ATYPICAL AUTOSOMAL RECESSIVE
JUVENILE PARKINSONISM.**

Neuroscience Letters

Volume 289, Issue 1

28 July 2000

Pages 66-68

A new mutation in the parkin gene in a patient with atypical autosomal recessive juvenile parkinsonism

Esteban Muñoz(a), Pau Pastor(a), María J. Martí(a), Rafael Oliva(b) and Eduardo Tolosa(a)

(a) Parkinson's disease and Movement Disorders Unit, Neurology Service, Institut Clínic Malalties Sistema Nerviós, Hospital Clínic i Universitari, University of Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

(b) Genetics Service, Hospital Clínic i Universitari and Human Genome Research Group, University of Barcelona, IDIBAPS, 170 Villarroel, 08036 Barcelona, Spain

Abstract

We have investigated the presence of mutations in the parkin gene in patients with early-onset parkinsonism. Direct sequencing of the polymerase chain reaction (PCR) products

showed a homozygous G deletion in the exon 7 (c.871delG) in one patient. This was a 38-year-old Moroccan woman with a history of parkinsonism of 18 years of duration. The disease appeared as an apparently sporadic case and was characterized by dystonia of the legs at onset and a rapid progression to severe generalized parkinsonism but with an excellent maintained response to dopamine agonists treatment. The deletion was a frameshift mutation resulting in a stop codon at position 297 which causes truncation of the parkin protein. Mutations in the parkin gene can be encountered in patients with an apparently sporadic early-onset parkinsonism, rapidly progressive course and marked and maintained response to dopamine agonists.

Author Keywords: Parkinson's disease; Genetics; Autosomal recessive juvenile parkinsonism; Parkin gene; Mutations

Autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP) is characterized by early onset of parkinsonian signs, dystonia at onset, diurnal fluctuations, slow disease progression and early levodopa-induced dyskinesias [4]. Pathological studies have shown several differences between ARJP and Parkinson's disease (PD), being the most striking of them the absence of Lewy bodies in ARJP [3, 9 and 10].

The locus responsible for ARJP was first mapped to chromosome 6q25.2-27 [8]. One year later, a novel gene, designated parkin, was identified in this locus and homozygous deletions of exon 4 or exons 3-7 were detected in four Japanese families with ARJP [5]. Subsequently, homozygous exonic deletions and homozygous and heterozygous point mutations in the

parkin gene have been also described in European and North African families with ARJP [1, 6 and 7]. In this article, we report a new mutation in a patient with early onset parkinsonism with some atypical clinical features for ARJP.

Forming part of a project to identify mutations in the parkin gene, blood samples of 17 patients (nine apparently sporadic and eight unrelated familial cases) with juvenile or early onset PD were obtained after informed consent. DNA was isolated from the leukocytes through standard procedures. The different exons of the parkin gene were amplified from genomic DNA through polymerase chain reaction (PCR) using primer sequences and conditions previously described [5 and 7]. The PCR mix was made in a total volume of 25 μ l and consisted of 13.3 μ l distilled water, 4 μ l of each dNTP at 1.25 mM, 2.5 μ l 10 \times buffer (100 mM Tris⁻ HCl, 500 mM KCl, 0.1% gelatin, 1.5 mM MgCl₂), 150 ng genomic DNA, 10 pmol of each primer, and 1 U of Taq polymerase. A single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) of the PCR products was carried out in a 7.5% polyacrilamide gel with 5% glycerol through electrophoresis at room temperature. The bands corresponding to the PCR amplification products were visualized through silver staining. Subsequently, the PCR products appearing as an abnormal band in the SSCP were sequenced. The normal cDNA sequence of parkin gene (DNA Data Bank of Japan: AB009973) was obtained from the GenBank database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>.

SSCP showed a thicker band in the PCR product of exon 7 in one sample of a patient as compared to control subjects and other parkinsonian patients. Sequence analysis including the exon-intron boundaries showed, according to the new recommendations for the

nomenclature of human gene mutations [2], a c.871delG that was homozygous for the patient and heterozygous for one healthy brother (Fig. 1). This deletion is a frameshift mutation that occurs close to the splice site. The change in the amino acids sequence starts at codon 291 and leads to the appearance of a stop codon at position 297 that causes the truncation of the parkin protein (Fig. 2). Until now, two missense mutations had been described in exon 7, Arg256Cys and Arg275Trp [1], however the mutation present in our patient and her brother is a novel frameshift mutation. This type of point mutation causing protein truncation had been previously described in exon 2 and 3 but not in other exons [1].

Fig. 1. Sequence analysis of the exon 7 of the parkin gene. The coding sequence is indicated in capital letters and the intronic sequence is in lower case. (A) Normal sequence in a control subject. (B) Homozygous mutation consisting in a G deletion (c.871delG) in the patient. (C) Heterozygous c.871delG mutation in the patient's brother. Arrows indicate the site of the deletion.

Fig. 2. cDNA and protein sequence resulting from splicing of exon 7 and 8. (A) Normal sequence (B) Mutated sequence. The c.871delG mutation causes protein truncation at codon 297.

The homozygous c.871delG mutation corresponded to a 38-year-old Moroccan woman that began her disease when she was 20 with a dystonic posture of her right leg while walking and especially when she was tired. Two years later she noted tremor in her left leg. Then she started treatment with bromocriptine 2 mg tid with an initial good response of tremor and

dystonia. At the age of 24, the tremor involved face and all four extremities, she had difficulties to walk and presented generalized bradykinesia. She was treated with bromocriptine 5 mg tid, but motor disability was worsening in the following years. She was seen at our hospital at the age of 28. On examination, after 24 h of medication withdrawal, the patient presented moderate dysarthria, facial hypomimia and generalized resting tremor involving the face and extremities. Moderate postural tremor in the upper-limbs was also seen. She had severe rigidity and bradykinesia in all extremities and was unable to walk or to rise from a chair without help. Her gait was with short steps, festination and freezing. Postural reflexes were impaired, without recovery in the retropulsion pull test. A dystonic posture of both lower limbs with inward deviation of both feet was also present. The part III of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) scored 70. The Hoehn and Yahr stage was 4 and the Schwab and England scale scored 30%. No other neurological abnormalities were detected on examination. The patient was treated with bromocriptine up to 30 mg/day with a dramatic response to medication. After treatment, the UPDRS score decreased to 9, the Hoehn and Yahr stage became 1.5 and the Schwab and England scale was 80%. Eighteen years after the disease onset, the patient has not required levodopa and maintains a good response to bromocriptine 10 mg tid and biperidine 2 mg tid. The family history was negative for parkinsonism but her parents were distant relatives. She was the fifth of eight siblings (Fig. 3). All relatives but one brother are actually living in Morocco being very difficult the communication with them, but they are presumable in good health.

Fig. 3. Pedigree of the family of our patient. Arrows indicate the patient (<Imagen>) and the brother studied.

The parkinsonian syndrome in our patient had some atypical features for ARJP or PD.

Although ARJP is characterized by slow disease progression, our patient presented with rapidly progressive parkinsonism with early gait disturbances and loss of postural reflexes.

PD patients can respond initially to dopamine agonists but the effect tends to decrease after few years of treatment and levodopa is then needed. However, our patient had an excellent response to dopamine agonists during more than 15 years of treatment without development of dyskinetic movements or motor fluctuations.

The case reported here suggests that mutations in the parkin gene can occur in patients with:

(i) apparently sporadic early onset parkinsonism, as suspected for an autosomal recessive disorder; (ii) rapidly progressive course; and (iii) excellent and sustained response to dopamine agonists, even in advanced stages of the disease.

Acknowledgements

This work was supported by grants of the Hospital Clínic Universitary (Barcelona), Generalitat de Catalunya (1999SGR-00226) to Dr Oliva, and Generalitat de Catalunya (1998SGR-00119) to Dr Tolosa. The authors acknowledge the clinical assistance provided by Mercè Francés.

References

1. N. Abbas, C.B. Lucking, S. Ricard, A. Durr, V. Bonifati, G. De Michele, S. Bouley, J.R. Vaughan, T. Gasser, R. Marconi, E. Broussolle, C. Brefel-Courbon, B.S. Harhangi, B.A. Oostra, E. Fabrizio, G.A. Bohme, L. Pradier, N.W. Wood, A. Filla, G. Meco, P. Deneffe, Y. Agid and A. Brice, A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. *Hum. Mol. Genet.* 8 (1999), pp. 567-574.
[Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-BIOTECHNOBASE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#) | [Full-text via CrossRef](#)
2. The Nomenclature Working Group S.E. Antonarakis, Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations. *Hum. Mut.* 11 (1988), pp. 1-3.
3. L.S. Forno, Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55 (1996), pp. 259-272. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#) | [Abstract-Elsevier BIOBASE](#)
4. A. Ishikawa and S. Tsuji, Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type juvenile parkinsonism. *Neurology* 47 (1996), pp. 160-166.
[Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#)
5. T. Kitada, S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno and N. Shimizu, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392 (1998), pp. 605-608. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-](#)

BIOTECHNOBASE | Abstract-EMBASE | Abstract-Elsevier BIOBASE

6. E. Leroy, D. Anastasopoulos, S. Konitsiotis, C. Lavedan and M.H. Polymeropoulos, Deletions in the parkin gene and genetic heterogeneity in a Greek family with early onset Parkinson's disease. *Hum. Genet.* 103 (1998), pp. 424-427. Abstract-MEDLINE | Abstract-EMBASE | Abstract-BIOTECHNOBASE | Abstract | Full-text via CrossRef

7. C.B. Lucking, N. Abbas, A. Durr, V. Bonifati, A.M. Bonnet, T. de Broucker, G. De Michele, N.W. Wood, Y. Agid and A. Brice, Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Lancet* 352 (1998), pp. 1355-1356. Abstract-EMBASE

8. H. Matsumine, M. Saito, S. Shimoda-Matsubayashi, H. Tanaka, A. Ishikawa, Y. Nakagawa-Hattori, M. Yokochi, T. Kobayashi, S. Igarashi, H. Takano, K. Sanpei, R. Koike, H. Mori, T. Kondo, Y. Mizutani, A.A. Schaffer, Y. Yamamura, S. Nakamura, S. Kuzuhara, S. Tsuji and Y. Mizuno, Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile parkinsonism of chromosome 6q25.2-27. *Am. J. Hum. Genet.* 60 (1997), pp. 588-596. Abstract-MEDLINE | Abstract | Abstract-BIOTECHNOBASE

9. H. Mori, T. Kondo, M. Yokochi, H. Matsumine, Y. Nakagawa-Hattori, T. Miyake, K. Suda and Y. Mizuno, Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 51 (1998), pp. 890-892. Abstract-MEDLINE Abstract-EMBASE | Abstract

10. H. Takahashi, E. Ohama, S. Suzuki, Y. Horikawa, A. Ishikawa, T. Morita, S. Tsuji and F. Ikuta, Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathological study in a family. *Neurology* 44 (1994), pp. 437-441. [Abstract-MEDLINE](#) | [Abstract-EMBASE](#) | [Abstract](#)

**TRABAJO 6: RELATIVE HIGH FREQUENCY OF THE c.255delA
PARKIN GENE MUTATION IN SPANISH PATIENTS
WITH AUTOSOMAL RECESSIVE PARKINSONISM.**

Relative high frequency of the c.255delA parkin gene mutation in Spanish patients with autosomal recessive parkinsonism. (Sometido a Neurology)

E. Muñoz, E. Tolosa, P. Pastor, MJ. Martí, F. Valdeoriola, R. Oliva

ABSTRACT

Background: Autosomal recessive juvenile parkinsonism is a neurodegenerative disorder associated with mutations in the parkin gene. Exonic deletions, multiplications, as well as point mutations have been described. *Objective:* To search for the presence of parkin gene mutations in Spanish patients with Parkinson's disease (PD) and characterise the phenotype associated with the mutations. *Methods:* Thirty-seven PD patients with either early onset or autosomal recessive pattern of inheritance were screened for parkin gene mutation throughout PCR amplification of the exons 1 to 12 followed by single strand conformation polymorphism analysis. The PCR products with an abnormal pattern of motility were sequenced. *Results:* Parkin gene mutations were identified in 27% of patients. Dystonia at onset was present in only 3 patients. Choreiform dyskinesias were present in two patients out of six treated with levodopa. The disease began in 2 patients with postural tremor in the upper-limbs mimicking essential tremor. Four patients exhibited a long-term response to dopamine agonists. Homozygous mutations were detected in 7 index patients and heterozygous mutations in 3. The c.255delA mutation was identified in 4 unrelated families. This is a frameshift mutation leading to protein truncation. This mutation was found in 1 out of 200 control chromosomes suggesting that the frequency of homozygous carriers in the Spanish population could be of 1/40,000. *Conclusions:* Parkin gene mutations are also present in Spanish patients with early-onset and/or an autosomal recessive parkinsonism. The disease shows an inter and intrafamilial clinical heterogeneity. The c.255delA is the most

frequent mutation found suggesting a relative high prevalence in the Spanish population.

INTRODUCTION

Patients with parkinsonism associated with parkin gene mutations usually present an autosomal recessive pattern of inheritance and have an early-onset disease, with a mean age at onset of around 30 years. The disease is also characterised by a symmetric involvement, slow progression, foot dystonia at onset, hyperreflexia, good response to levodopa therapy and early levodopa-induced dyskinesias.^{1,2} However, unusual features such as a late-onset disease,^{3,4} which can begin at a similar age than those described in typical Parkinson's disease (PD), a rapidly progressive course⁵ or the presence of gait ataxia⁶ have been described in patients with parkin gene mutations. Few pathologic studies have been performed in patients with autosomal recessive juvenile parkinsonism (ARJP)⁷⁻⁹ but all of them show loss of neurones in the substantia nigra and locus coeruleus without the presence of Lewy bodies.

Many mutations (exonic deletions and multiplications, and point mutations) have been described in the parkin gene in patients from different populations.^{1,2} We have searched for parkin gene mutations in our PD patients in order to identify new mutations and to define further the clinical spectrum associated with these mutations. We have found a mutation in the exon 2 (c.255delA) in four unrelated PD patients suggesting that the prevalence of this mutation in our population may be relatively high.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

Patients fulfilling the clinical diagnostic criteria for PD proposed by the UK Parkinson's Disease Society Brain Bank, except for the exclusion criteria of familial disorder,¹⁰ were recruited from the PD Movement Disorder Unit of Hospital Clinic of Barcelona. Clinical assessment was made using the Unified Parkinson Disease Rating Scale (UPDRS), the modified Hoehn and Yahr stage and the Schawb and England scale. Control subjects were recruited among healthy donors without familial history of PD or tremor.

Parkinsonian patients with age at onset ≤ 40 years or patients with an autosomal recessive pattern of inheritance were selected for genetic study. The study was approved by the Ethical Committee of our Hospital.

Genetic study

Blood samples from parkinsonian patients and controls were drawn after informed consent was obtained. DNA was isolated from leukocytes by standard procedures. The different exons of the parkin gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers and conditions as described.^{1,11} The PCR mix was made in a total volume of 25 μL and consisted of 13.3 μL distilled water, 4 μL of each dNTP at 1.25 mM, 2.5 μL 10x buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0.1% gelatin, 1.5 mM MgCl_2), 150 ng genomic DNA, 10 pmol of each primer, and 1 U of Taq polymerase.

A single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) of the PCR products was carried out through electrophoresis in two different conditions: 7.5% polyacrilamide gel at room temperature and 12% polyacrilamide gel at 4° C. The bands were visualized after silver staining. The PCR products with an abnormal motility pattern were sequenced using

the dye terminator cycle sequencing ready reaction and run on a ABI-prism automatic DNA sequencer (Perkin Elmer).

The normal cDNA sequence of parkin gene (DNA Data Bank of Japan: AB009973) was obtained from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Genbank)

Statistical assessment

Means were compared with the nonparametric Mann-Whitney U test. Frequencies were compared with the chi-square test.

RESULTS

We identified 37 index patients (17 women/20 men) fulfilling the criteria proposed for the screening of mutations in the parkin gene. Twenty-four were familial PD cases, with other siblings affected, and 13 were sporadic early-onset PD cases. The mean age at onset (\pm SD) was 42 ± 14.5 years (range: 9 to 75) for the whole group, 47.7 ± 13.5 years (range: 29 to 75) for the familial cases and 31 ± 8.9 years (range: 9 to 40) for the apparently sporadic cases. Mean disease duration (\pm SD) was $14,6\pm 8,3$ years (range: 2 to 43 years).

We identified parkin gene mutations in 10 patients (27%). Three patients were sporadic cases and 7 familial cases. We did not find significant differences when comparing the frequency of mutations between the sporadic and the familial groups ($p=0.5$). Nine patients were Spanish and one patient came from Morocco (PK-11). The mean age at onset (\pm SD) was 37.3 ± 18.7 years in patients with mutations and 43.8 ± 12.7 years in patients without mutations ($p=0.08$).

Dystonia was only found in 3 patients with mutations. Two of them began the disease at the age of 9 and 20 years respectively, and the other patient at the age of 30 (Table). All patients had a good response to levodopa and/or other dopamine agonists. The mean (\pm SD) motor score of the UPDRS in the “on” stage was 22.7 ± 11.8 . Only patient PK-11 could be evaluated without medication (“off” situation) showing feet dystonia and severe bilateral parkinsonism with marked impairment of the postural reflexes. However, under the effect of the medication (“on” situation) she only showed mild parkinsonian symptoms. This patient has been described previously by us.⁵ Two out of six patients (PK-167 and PK-205) treated with levodopa showed choreiform “on” dyskinesias.

Homozygous mutations were found in 7 index patients and heterozygous mutations in 3 (Figure 1). Homozygous mutations consisted of 2 frameshift mutations, c.255delA found in 4 patients and c.972delG found in one patient, 1 exon rearrangement, exon 5-6del in 1 patient, and 1 missense mutation (c.1239G>C). Heterozygous mutations consisted of 3 missense mutations (Figure 1). The c.1239G>C mutation was also found in heterozygosity in another family.

c.255delA mutation

The c.255delA mutation was the most frequent mutation in our population of patients (figure 2). It was found in four unrelated patients. All of these patients but one were living in Barcelona but they were originally from other regions in Spain. Parents' consanguinity was confirmed only in one case (PK-21). The mean age of disease onset was 34 years. All patients developed symmetrical parkinsonian signs (tremor, rigidity and bradykinesia). Only one patient had limb dystonia at onset (PK-184). This patient is now 64 year-old and she is treated only with the dopamine agonist bromocriptine. One patient was initially diagnosed to have essential tremor (PK-21) because for several years he only exhibited postural tremor on his hands. Tremor responded partially to propranolol. He is now treated with very low doses of levodopa and selegiline. In the third case (PK-131), the patient began her disease with tremor in the upper-limbs which was present at rest but increased her frequency notably when she held the arms outstretched. The last patient (PK-201) presented with a predominant lower body parkinsonism, with slow gait and short steps, and has experimented an excellent response to bromocriptine, trihexyphenidyl and selegiline up to now.

The genetic study of siblings in patients PK-21 and PK-131 lead us to identify heterozygous and homozygous carriers of the mutation. One homozygous carrier, a 47 year-old woman

who is the sister of patient PK-21, has not been examined by us, but she refers she is in good health. In other two homozygous carriers there were clear parkinsonian features. One patient (PK-21 sister) was a 56 year-old woman who had been diagnosed of PD at the age of 35. She showed motor fluctuations with severe parkinsonian signs and gait instability in the “off” stage and levodopa-induced dyskinesias when she was under the effect of the medication. The other homozygous patient (PK-131 sister) was a 42 year-old woman who has not been diagnosed of having PD previously but on the examination she showed bradykinesia and slight symmetrical rigidity on the extremities associated with minimal postural tremor on her hands.

Both homozygous and heterozygous mutated alleles showed a clear and reproducible pattern of bands by SSCP that were different from those obtained for normal alleles (Figure 3). Thus, we considered that SSCP was an easy method to investigate the presence of the c.255delA mutation in normal subjects in order to estimate the prevalence of this mutation in our population.

Subsequently, we screened for the c.255delA mutation in 100 healthy control subjects and found a single subject with an abnormal SSCP pattern identical to the one obtained for the heterozygous mutation. The presence of the mutation was confirmed after sequencing the PCR product. Subsequently, the application of the Hardy-Weinberg principle allows us to calculate an approximate genetic risk of 1/40,000. So, we estimate that about 1000 individuals could be homozygous carriers for the mutation in the Spanish population.

DISCUSSION

We found parkin gene mutations in 23% of sporadic early-onset PD cases and in 29% of familial PD cases with an autosomal recessive pattern of inheritance. The clinical features of our patients lead us to confirm a phenotypic variability in patients with parkin gene mutations.

The age at onset in patients with mutations varied from 9 to 69 years. Only 3 (27,3%) patients presented foot dystonia at onset. In two of them the disease had a juvenile onset (\leq 20 year-old). Dystonia has been reported in 42% of patients with parkin gene mutations.¹ However, in this study the mean (\pm SD) age at onset (32 ± 11) was lower than in our study ($37\pm 18,7$) because they only included families in which at least one of the affected family members had begun the disease at or before the age of 45. Taking into account both studies, it suggests that dystonia is more frequent in patients with disease onset at an age earlier than thirty.

The motor score of the UPDRS with the patients under the effect of medication (“on” situation) showed a mild to moderate parkinsonism. However, one patient (PK-167) had severe loss of postural reflexes and could not walk without help 15 years after the disease onset. Gait abnormalities have been previously reported in patients with ARJP¹² and parkin gene mutations². The lack of response of the gait disorder to levodopa suggests that other pathways different from dopaminergic circuits may be involved in our patient gait. Recently, the presence of neuronal loss in the cerebellum and tau deposition in the caudate, putamen and subthalamic nuclei and substantia nigra has been reported in the clinical and pathologic study of a patient with parkinsonism and ataxia related to parkin gene mutations.⁴ The presence of similar abnormalities could explain the gait disorder in our case.

Levodopa-induced dyskinesias were present in two of our patients. None of the five patients who were only taking dopamine agonists complained of dyskinesias. Two of them have been treated with dopamine agonists for over 15 years. This finding suggests that some patients with parkin gene mutations may respond successfully to dopamine agonists for a long period of time and, on the other hand, it could act preventing the appearance of dyskinetic movements.

The 1239G>C and 1281G>A mutations have been described previously in other parkinsonian patients and control subjects,^{3,13} so they have not been considered pathogenic mutations. The presence of the 1239G>C has been investigated in sporadic PD in order to determine whether this polymorfism confers a susceptibility for the disease.¹³ The allele C has been found in 3.4% of the control subjects and in 1.9% of the PD patients supporting that this change is not related to sporadic PD. We have also found that the 1239G>C mutation does not segregate with the disease in one family.

The most relevant finding in our study was the presence of the same mutation (c.255delA) in 4 unrelated Spanish patients suggesting that this mutation could be relatively frequent in our population. The presence of the mutation in 1 out of 200 chromosomes from healthy controls supports this view. We have estimated that the frequency of homozygous carriers for the mutation could be 1/40,000 in Spain. Although we can not rule out a random effect for our findings, there are other evidences supporting that c.255delA may be a frequent mutation. This mutation has previously been described in another Spanish patient¹⁴ and in other 6 European patients.²

The c.255delA is a frameshift mutation that leads to a change into the amino acid sequence starting at codon 52 (Asn52Met) and the appearance of a stop codon (TGA) at position 80 that truncates the parkin protein. The age at onset of the disease in patients

carrying this mutation varies from 30 to 41 years in our series. However, we have found this mutation in a healthy subject (PK-131 sister) whose current age is 47 years, suggesting that other genetic or environmental factors may be involved in the disease expression.

Intrafamilial variability of the age at onset has previously been reported in a family from Italy with a deletion of exon 4; one member of this family began the disease at the age of 58 whereas two siblings did it at the age of 38 and 41 respectively.³ Interfamilial phenotype variability for the c255delA mutation is also showed in our study. Whereas only one patient had dystonia at onset, other two presented with predominant postural tremor in the upper-limbs mimicking essential tremor.

We are aware that some mutations could have been missed in our study because of the approach we have used to detect mutations. The SSCP analysis performed by us using two different conditions has a high sensitivity but it is not 100%.^{15,16} Moreover, heterozygous exon deletions or exon multiplications require a semiquantitative PCR for their detection. Unfortunately, this technique is not available in our laboratory yet. However, our work confirms the presence of parkin gene mutation in Spanish PD patients and contributes to the characterization of the phenotype in patients with parkin gene mutation. Moreover, it has allowed us to outline a relative high prevalence of the c.255delA mutation in our population. The clinical spectrum of parkin gene mutations remains open to discussion and further genetic and pathological studies are still needed to confirm our findings.

REFERENCES

1. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392:605-608.
2. Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *N Eng J Med* 2000;342:1560-1567.
3. Abbas N, Lücking CB, Ricard S, et al. A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. *Hum Mol Genet* 1999;8:567-574.
4. Klein C, Pramstaller PP, Bernhard K. Parkin deletions in a family with adult-onset, tremor-dominant parkinsonism: expanding the phenotype. *Ann Neurol* 2000;48:65-71.
5. Muñoz E, Pastor P, Martí MJ, Oliva R, Tolosa E. A new mutation in the parkin gene in a patient with atypical autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Neurosci Lett* 2000;289:66-68.
6. van de Warrenburg BPC, Lammens M, Lücking CB. Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology* 2001;56:555-557.
7. Yamamura Y, Arihiro K, Kohriyama T, Nakamura S. Early-onset parkinsonism with diurnal fluctuation: clinical and pathological studies. *Clin Neurol* 1993;33:491-496.
8. Takahashi H, Ohama E, Suzuki S, et al. Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathological study in a family. *Neurology* 1994;44:437-441.
9. Mori H, Kondo T, Yokochi M, et al. Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 1998;51:890-892.
10. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181-184.

11. Lücking CB, Abbas N, Dürr A, et al. Homozygous deletions in parkin gene in European and North African families with autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Lancet* 1998;352:1355-1356.
12. Ishikawa A, Tsuji S. Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type juvenile parkinsonism. *Neurology* 1996;47:160-166.
13. Wang M, Hattori N, Matsumine H. Polymorphism in the parkin gene in sporadic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1999;45:655-658.
14. Hoernicka J, Vidal L, Morales B, Astarloa R, Berciano J, Jiménez A, et al. *Mov Disord* 2000;15 (suppl): 200. Abstract.
15. Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, et al. SSCP analysis: A blind sensitive trial. *Human Mutation* 1997;10:65-70.
16. Ellis LA, Taylor CF, Taylor GR. A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HCPL for high throughput mutation scanning. *Human Mutation* 2000;15:556-564.

LEGENDS

Figure 1. Parkin gene mutations found in our population. The number of index patients with mutations is given in brackets.

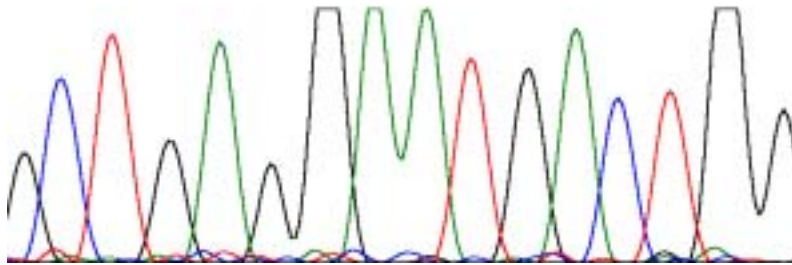
Figure 2. Electropherograms of the sense strand showing the wild type sequence in a control subject and the presence of the 255delA mutation in a patient (PK-131). The deletion induce a change into the amino acid sequence starting at codon 52 with the substitution of asparagine by methionine (Asn52Met) and the appearance of a stop codon at position 80.

Figure 3. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) of the exon 2 showing different patterns of motility in control subjects, homozygous and heterozygous carriers of the 255delA mutation.

Figure 2

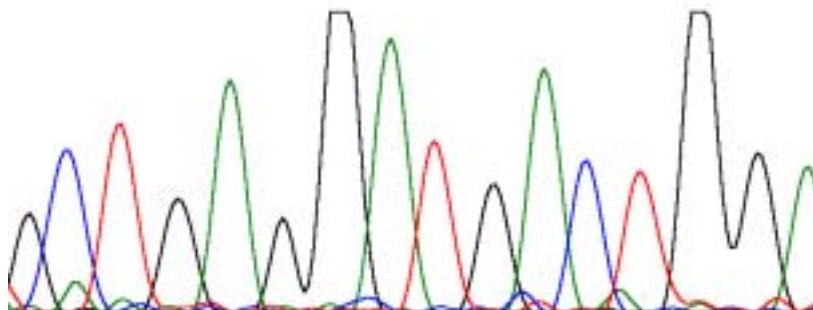
Control

G C T G A G G A A T G A C T G G



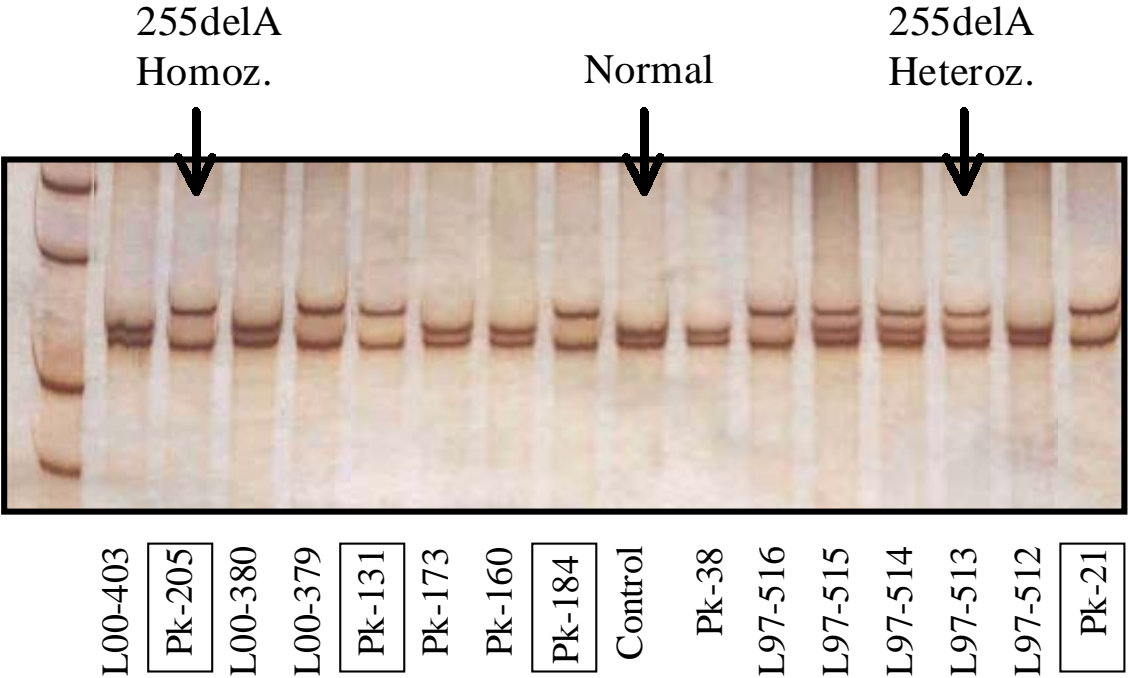
PK-131

G C T G A G G A T G A C T G G A



255delA
Asn52Met
80 Stop

Figure 3



**TRABAJO 7. ENFERMEDAD DE PARKINSON ESPORÁDICA Y
FAMILIAR: ESTUDIO COMPARATIVO**

ENFERMEDAD DE PARKINSON ESPORADICA Y FAMILIAR: ESTUDIO**COMPARATIVO**

Esteban Muñoz¹, Pau Pastor¹, María José Martí¹, Francesc Valldeoriola¹, Rafael Oliva² y Eduardo Tolosa¹.

¹Unidad de Movimientos Anormales. Servicio de Neurología. ²Servicio de Genética. Hospital Clínic i Universitari de Barcelona. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Med Clin (Barc) 2001;116:601-604

INTRODUCCION

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo progresivo cuya incidencia aumenta con la edad, afectando a más del 1% de la población por encima de los 55 años y al 3,1% de los sujetos entre 75 y 84 años¹. Los pacientes presentan temblor, lentitud de movimientos, rigidez y trastorno progresivo de la marcha. El sustrato anatomopatológico de la EP viene condicionado por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y el depósito de cuerpos de Lewy en las neuronas supervivientes.

La causa de la enfermedad es desconocida en la mayoría de casos; sin embargo, se ha considerado que el factor de riesgo más importante para desarrollar la enfermedad, a parte de la edad, es la existencia de antecedentes familiares de EP o temblor². Mediante estudios de casos- controles se ha demostrado un riesgo significativamente aumentado de desarrollar la enfermedad en los familiares de primer grado de pacientes con EP^{3,4}. Además, se han descrito familias extensas afectas por la enfermedad con un patrón de herencia de tipo autosómico dominante^{5,6,7}. En algunos casos de EP familiar de herencia autosómica dominante se han encontrado mutaciones en el gen de la α -sinucleína^{7,8}, que está localizado en el cromosoma 4; mientras que en casos familiares con un patrón autosómico recesivo se han descrito diversas mutaciones en un nuevo gen denominado Parkin^{9,10,11}, situado en el cromosoma 6. Todo ello sugiere que los factores genéticos pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la EP.

Los objetivos del presente trabajo fueron identificar la presencia de casos familiares de EP en nuestra población de pacientes y comparar las características clínicas de los casos familiares con las de los casos esporádicos de EP.

PACIENTES Y METODOS

Los pacientes afectos de EP, visitados en consultas externas del Servicio de Neurología del Hospital Clínic i Universitari de Barcelona, entre abril de 1997 a mayo de 2000, fueron interrogados sobre la existencia de otros miembros de la familia afectos por la enfermedad. El diagnóstico de EP se basó en criterios diagnósticos internacionalmente reconocidos (Parkinson's Disease Society Brain Bank of London)¹². Los pacientes fueron clasificados como afectos de una EP esporádica si no existían antecedentes de la enfermedad en otros miembros de la familia, o como una EP familiar si existía algún otro miembro de primer o segundo grado afecto. En los casos en que no pudimos valorar personalmente al familiar afecto, bien porque había fallecido o bien porque estaba muy distante geográficamente, la inclusión como EP familiar se hizo siguiendo criterios previamente propuestos⁴.

Todos los casos esporádicos y la mayoría de los familiares procedían de nuestro centro. Se analizó la edad de inicio, la edad actual, el género, y la severidad clínica de la enfermedad con el paciente en "on" (bajo los efectos de la medicación) o en "off" (sin efecto de la medicación) mediante el examen motor de la escala unificada de la EP (UPDRS), el estadio de Hoehn y Yahr y la escala de actividades de Schawb y England. Además se analizó el subtipo clínico que presentaban los pacientes en base a si predominaba el temblor (tremorígeno), la rigidez (rígido) o ambos (mixto). La valoración del subtipo clínico se hizo con el paciente en estadio "off" o se utilizó el último examen de la escala motora de la UPDRS con el paciente en "off" si habían transcurrido menos de 12 meses desde que se realizó esta valoración. La EP se clasificó como mixta cuando en la UPDRS la puntuación del temblor y la rigidez era igual o superior a 2 al menos en una de las extremidades. Cuando el temblor era igual o superior a 2 y la rigidez inferior a 2 en cualquier extremidad, se clasificó como predominantemente tremorígeno.

Cuando la rigidez era igual o superior a 2 y el temblor inferior a 2 en cualquier extremidad, se clasificó como predominante rígido.

En los casos familiares se construyó un árbol genealógico para valorar el tipo de herencia y se analizó la posibilidad de anticipación genética cuando en una misma familia la enfermedad se manifestaba en padres e hijos.

La comparación estadística de los resultados entre los casos familiares y esporádicos se realizó mediante los test de chi-cuadrado y U de Mann-Whitney para las pruebas no paramétricas y un t-test no pareado para las paramétricas.

RESULTADOS

De los 402 casos de EP controlados en nuestro Servicio, se identificaron 56 casos de EP familiar correspondientes a 53 familias, lo que supone que en nuestra población de pacientes el porcentaje de casos familiares es de alrededor del 13%. De estas 53 familias, fueron valorados clínicamente un total de 63 miembros. Otros 8 casos familiares correspondientes a 5 familias, no controlados en nuestro Centro y que fueron remitidos por otros neurólogos, fueron también incluidos en el estudio, por lo que el número final de pacientes con antecedentes familiares de EP que fueron estudiados fue de 71. En otros 21 pacientes el diagnóstico de EP familiar fue dudoso⁴.

En 237 casos se obtuvo información fidedigna de la edad de inicio, siendo la edad media de 55,9 años (Tabla). Cuando se comparó la edad de inicio de los casos esporádicos con los familiares, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Aunque tanto en los casos familiares como esporádicos, la edad media de inicio fue superior en las mujeres que en los hombres, las diferencias no fueron significativas. Sin embargo, cuando se incrementó la muestra analizando la edad de inicio de forma conjunta para todos los grupos (familiar, esporádico y dudoso), la edad de inicio en mujeres ($57,4 \pm 13$) fue significativamente mayor que en los hombres ($54,8 \pm 11,4$) ($p=0,045$) (Figura 1).

El examen clínico realizado en 169 pacientes (95 esporádicos, 62 familiares y 12 con antecedentes dudosos de EP) mediante la UPDRS, la escala de Schwab and England y el estadio de Hoehn y Yahr tanto con el paciente en “on”, como en “off”, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los casos esporádicos y los familiares (Tabla).

La mayoría de pacientes (49%) presentaban temblor y rigidez en la exploración (forma mixta), en el 28,4% de los pacientes había rigidez con nada o muy poco temblor (forma rígida),

y en el 22,5% de los casos predominaba el temblor (forma tremórigena) (Tabla). Cuando se analizó por grupos, se encontró una mayor proporción de la forma predominantemente tremórigena en los casos familiares (35,5%) que en los casos esporádicos (16,3%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2= 8,2$; $p=0,016$). En algunas de nuestras familias coexistían miembros con EP junto con otros familiares de primer y segundo grado con temblor esencial; además, algunos pacientes habían sido diagnosticados de temblor esencial años antes de haber desarrollado la EP (figura 2).

El análisis del patrón de herencia de los 58 casos familiares fue compatible con una herencia autosómica dominante de baja penetrancia en la mayoría de casos, o con una herencia autosómica recesiva, ya que en 9 casos sólo existía el antecedente de EP en otro hermano. En 22 casos, uno de los progenitores estaba afecto. En 11 casos la herencia fue por vía paterna y en otros 11 por vía materna. En 6 casos había más de un hijo afecto siendo la herencia por vía paterna en 5 casos y materna en 1 sólo. En 14 casos familiares se pudo determinar la edad de inicio de los síntomas en los progenitores, siendo la edad media de éstos de $68 \pm 7,8$ años, mientras que en los descendientes la edad media de inicio fue de 53 ± 13 años ($p= 0,001$). En sólo 2 casos la enfermedad se inició a una edad más temprana en los padres que en los hijos. En 3 casos, la enfermedad fue diagnosticada en los hijos antes de que apareciese en los padres.

DISCUSION

El porcentaje de casos de EP familiar encontrado en nuestro estudio fue del 13%. En diversos estudios esta frecuencia osciló entre el 13 y el 33%^{2,3,13,14}, lo que sugiere que en algunos casos podría existir una predisposición genética para el desarrollo de la enfermedad. Hasta ahora, los estudios genéticos en la EP, focalizados en determinados genes, como la α -1-antiquimotripsina, la debrisoquina hidroxilasa (CYP2D6) y otros genes que participan en la síntesis y el metabolismo de la dopamina, como el gen de la tirosina hidroxilasa y el de la monoamino oxidasa B y A, no han permitido identificar, de forma concluyente, un factor genético capaz de conferir una susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad^{6,15}. Mientras que las mutaciones descritas en el gen de la α -sinucleína son una causa rara de EP familiar^{16,17}, la presencia de mutaciones en el gen Parkin son relativamente frecuentes en los casos con un patrón de herencia autosómico recesivo¹¹. Sin embargo, este tipo de patrón hereditario no es frecuente, por lo que es necesario insistir en la búsqueda de otros genes candidatos, diferentes a los hasta ahora estudiados, para poder explicar la mayoría de casos familiares de EP.

En nuestro estudio, la edad media de inicio de la EP fue similar a la encontrada por Diamond et al¹⁸, pero más precoz que la reportada por Lyons y cols.¹⁹ que fue de 66,5 años. Sin embargo, en nuestro caso, no podemos descartar la existencia de un sesgo debido a que los pacientes jóvenes podrían tender a derivarse hacia nuestro Hospital ya que es un centro de referencia de EP. El inicio más precoz de la EP en hombres que en mujeres sugiere que factores asociados al género, ya sean estos hormonales o de otro tipo, podrían modular el inicio de la enfermedad. Recientes trabajos experimentales en modelos animales de EP demuestran que los estrógenos pueden tener un efecto neuroprotector^{20,21}, lo que podría contribuir al retraso en el inicio de la enfermedad en las mujeres de nuestro estudio o a la menor incidencia de la EP en

mujeres encontrada en otros estudios^{18,22}. Contrariamente a nuestros resultados, Lyons y cols.¹⁹ no encuentran diferencias en la edad de inicio entre hombres y mujeres; sin embargo, su población presenta una mayor edad media de inicio, lo que sugiere que tienen pocos casos jóvenes, y por lo tanto, el posible efecto neuroprotector que pudieran ejercer los estrógenos podría haberse perdido con el tiempo.

El análisis del subtipo clínico que presentaban nuestros pacientes mostró un predominio de la forma tremorígena en los casos familiares en comparación con los esporádicos. En un estudio previo realizado sobre 50 familias con EP, se reportó un predominio del temblor en 36 de ellas²³. Además en diversos estudios se ha encontrado una correlación entre el antecedente familiar o personal de temblor esencial y el desarrollo de la EP^{2,14,23,24}. En nuestro estudio, la coexistencia de miembros con temblor esencial con otros con EP (figura 2) o el antecedente de temblor esencial antes de iniciar la EP sugiere que ambas patologías podrían cosegregar en algunos casos.

La edad de inicio y el grado de discapacidad de la enfermedad analizado mediante las diferentes escalas de evaluación clínica no fue diferente en los casos familiares que en los esporádicos, siendo la duración media de la enfermedad similar en ambos grupos. Estudios previos tampoco mostraron diferencias significativas entre casos esporádicos y casos familiares en cuanto a la edad de inicio y la severidad de la enfermedad^{24,25}, aunque en un estudio se reportó una edad de inicio más precoz en las formas familiares¹⁴.

En los casos familiares de EP en que había afectación de padres e hijos, la edad de inicio en los hijos fue significativamente menor que en los padres, lo que sugiere un posible mecanismo de anticipación genética en la EP familiar. Curiosamente, en 3 de nuestros casos familiares la enfermedad fue diagnosticada en los hijos antes de que apareciera en sus respectivos padres. La presencia de anticipación genética en la enfermedad de Parkinson ha sido

también reportada en otros estudios^{14,25}, aunque los hallazgos han sido cuestionados por la posible existencia de “sesgos” en la interpretación de los resultados, como puede ser el hecho de que la información sea obtenida retrospectivamente a través de los hijos o que éstos reconozcan en una fase más inicial la aparición de los síntomas de la enfermedad ya que tienen la experiencia previa de la enfermedad en sus padres²⁶.

Algunos estudios han demostrado la presencia de una disfunción mitocondrial en la EP²⁷, lo que podría sugerir que la EP es una enfermedad mitocondrial. En los casos familiares de nuestra serie, la enfermedad provenía indistintamente por vía paterna o materna, pero contrariamente a lo reportado por Wooten y cols.²⁸, cuando había más de un hijo afecto, el progenitor solía ser el padre; por lo que nuestro estudio, en concordancia con estudios previos²⁹, no apoya una herencia de tipo mitocondrial en la EP. Este hallazgo sugiere que la disfunción mitocondrial descrita en los pacientes con EP, más que un fenómeno primario, podría ser secundario; ya sea en relación al tratamiento con levodopa³⁰, a la acción de tóxicos ambientales³¹ o, al igual que se ha descrito en otras enfermedades neurodegenerativas³², a factores genéticos predisponentes determinados por el ADN nuclear.

RESUMEN

Fundamento: Diversos estudios han constatado que entre el 13% y el 33% de los pacientes con enfermedad de Parkinson (EP) presentan antecedentes familiares de la enfermedad. Los objetivos de este trabajo fueron identificar casos de EP familiar y analizar la existencia de rasgos distintivos entre los casos esporádicos y familiares.

Métodos: 402 pacientes con EP, controlados en el Hospital Clínic i Universitari de Barcelona fueron evaluados prospectivamente. En 169 pacientes se realizó un examen clínico utilizando diversas escalas. La EP fue subclasificada como predominantemente tremorígena, rígida o mixta en función de los síntomas que predominaban.

Resultados: La frecuencia de EP familiar fue del 13%. La edad de inicio no fue diferente en los casos familiares y esporádicos, pero fue significativamente mayor en las mujeres ($57,4 \pm 13$) que en los hombres ($54,8 \pm 11,4$) ($p < 0,05$). La forma tremorígena de EP fue más frecuente en los casos familiares (35,5%) ($p < 0,05$). En los casos de EP familiar, la edad de inicio fue menor en los hijos (53 ± 13) que en los padres ($68 \pm 7,8$) ($p = 0,001$).

Conclusiones: Los factores genéticos pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la EP, pudiendo existir factores ligados al género que modulen la edad de inicio de la enfermedad. Los casos familiares sólo se diferencian de los esporádicos en una mayor frecuencia de las formas predominantemente tremorígenas. La menor edad de inicio en los hijos que en los padres sugiere la existencia de un fenómeno de anticipación genética en la EP familiar.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson familiar. Patrón de herencia. Anticipación genética

SUMMARY

Objectives: Several studies have shown that the presence of a positive familial history of Parkinson's disease (PD) ranged from 13% to 33% of PD patients. The objectives of this work were to identify familial PD patients and analyse the presence of clinical differences between familial and sporadic cases.

Methods: 402 PD patients from the Hospital Clínic i Universitari of Barcelona were evaluated. Clinical assessment was made using different clinical scales in 169 patients. PD was subclassified as tremoric, rigid or mixed regarding the predominant symptoms.

Results: The frequency of familial PD was 13%. The age at onset was not different between familial and sporadic cases but it was significantly higher in females ($57,4 \pm 13$) than in males ($54,8 \pm 11,4$) ($p < 0,05$). The tremoric type of PD was more frequent in familial cases (35,5%) ($p < 0,05$). In familial PD cases, the age at onset was lower in descendants (53 ± 13) than in parents ($68 \pm 7,8$) ($p = 0,001$).

Conclusions: Genetic factors could play an important role in the development of PD and gender-associated factors could modulate the age at onset. Familial PD cases only differ from sporadic cases in the higher frequency of predominantly tremoric type. The lower age at onset in descendants than in parents suggest the existence of genetic anticipation phenomenon in familial PD.

Keywords: Familial Parkinson's disease. Pattern of inheritance. Genetic anticipation.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Rijk MC, Breteler MMB, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meché FGA, Hofman A. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam study. *Neurology* 1995;45:2143-2146.
2. De Michele G, Filla A, Volpe G, de Marco V, Gogliettino A, Ambrosio G, et al. Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: A case-control study in southern Italy. *Mov Disord* 1996;11:17-23
3. Payami H, Larsen K, Bernard S, Nutt J. Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. *Ann Neurol* 1994;36:659-661
4. Marder K, Tang MX, Mejia H, Alfaro B, Coté L, Louis E, et al. Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study. *Neurology* 1996;47:155-160.
5. Waters CH, Miller CA. Autosomal dominant Lewy body parkinsonism in a four-generation family. *Ann Neurol* 1994;35:59-64.
6. Gasser T, Wszolek ZK, Trofatter J, Ozelius L, Uitti RJ, Lee CS, et al. Genetic linkage studies in autosomal dominant parkinsonism: evaluation on seven candidate genes. *Ann Neurol* 1994;36:387-396.
7. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-2047.
8. Krüger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kösel S, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18:106-108.

9. Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, Tanaka H, Ishikawa A, Nakagawa-Hattori Y, et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile parkinsonism of chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet*, 1997;60:588-596.
10. Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, et al. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. French Parkinson's Disease Genetics Study Group. *N Engl J Med* 2000;342:1560-1567.
11. Muñoz E, Pastor P, Martí MJ, Oliva R, Tolosa E. A new mutation in the parkin gene in a patient with atypical autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Neurosci Lett* 2000;289:66-68.
12. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: A clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181-184.
13. Semchuk K, Love E, Lee R. Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology* 1993;43:1173-1180.
14. Bonifati V, Fabrizio E, Vanacore N, De Mari M, Meco G. Familial Parkinson's disease: A clinical genetic analysis. *Can J Neurol Sci* 1995; 22: 272-279
15. Muñoz E, Obach V, Oliva R, Martí MJ, Ezquerra M, Pastor P, et al. α_1 -antichymotrypsin gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Neurology* 1999;52:297-301.
16. Muñoz E, Oliva R, Obach V, Martí MJ, Pastor P, Ballesta F, Tolosa E. Identification of Spanish familial Parkinson's disease and screening for the Ala53Thr mutation of the α -synuclein gene in early onset patients. *Neurosci Lett* 1997;235:57-60.
17. Vaughan JR, Farrer MJ, Wszolek ZK, Gasser T, Durr A, Agid Y, et al. Sequencing of the α -synuclein gene in a large series of cases of familial Parkinson's disease fails to reveal

- any further mutations. *Hum Mol Genet* 1998;7:751-753.
18. Diamond SG, Markham CH, Hoehn MM, McDowell FH, Muentner MD. An examination of male-female differences in progression and mortality of Parkinson's disease. *Neurology*, 1990;40:763-766.
 19. Lyons KE, Hubble JP, Tröster AI, Pahwa R, Koller WC. Gender differences in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 1998;21:118-121.
 20. Disshon KA, Dluzen DE. Estrogen as a neuromodulator of MPTP-induced neurotoxicity: effects upon striatal dopamine release. *Brain Res* 1997;764:9-16.
 21. Miller DB, Ali SF, O'Callaghan JP, Laws SC. The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1988;844:153-165.
 22. DATATOP: A multicenter controlled clinical trial in early Parkinson's disease. Parkinson Study Group. *Arch Neurol* 1989;46:1052-1060.
 23. Roy M, Boyer L, Barbeau A. A prospective study of 50 cases of familial Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci* 1983;10:37-42.
 24. Maraganore DM, Harding AE, Marsden CD. A clinical and genetic study of familial Parkinson's disease. *Mov Disord* 1991;6:205-211.
 25. Planté Bordeneuve V, Taussig D, Thomas F, Ziegler M, Said G. A clinical and genetic study of familial cases of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1995;133:164-172
 26. Maraganore DM, Schaid DJ, Rocca WA, Harding AE. Anticipation in familial Parkinson's disease: A reanalysis of 13 United Kingdom kindreds. *Neurology* 1996;17:1512-1517.
 27. Cardellach F; Martí MJ, Fernández-Sola J, Marín C, Hoek JB, Tolosa E, Urbano-Márquez A. Mitochondrial respiratory chain activity in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *Neurology* 1993;43:2258-2262.
 28. Wooten GF, Currie LJ, Bennett JP, Harrison MB, Trugman JM, Parker WD. Maternal

- inheritance in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1997;41:265-268.
29. Zweig RM, Singh A, Cardillo JE, Langston JW. The familial occurrence of Parkinson's disease. Lack of evidence for maternal inheritance. *Arch Neurol* 1992;49:1205-1207
 30. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Muthane U et al. Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity. *Ann Neurol* 1993;34:715-723
 31. Singer TP, Castagnoli N Jr, Ramsay RR, Trevor AJ. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem* 1987;49:1-8.
 32. López de Munain A. Clasificación de las enfermedades mitocondriales. *Rev Neurol* 1998;26(supl 1):9-14.

V. DISCUSION GENERAL

1) Estudios de asociación genética

Hasta el momento ningún polimorfismo, en genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de la dopamina o de diversos tóxicos, se ha asociado de forma clara a la enfermedad de Parkinson. Los resultados obtenidos en diversos estudios han sido contradictorios debido quizá al número de individuos incluidos y el tipo de población analizada. En la población japonesa se ha reportado un riesgo aumentado de sufrir la enfermedad de Parkinson en sujetos portadores del polimorfismo AA de la α_1 -antiquimotripsina. En el **trabajo 1**, contrariamente a lo reportado en la población japonesa, se descarta que en nuestra población el alelo A o el genotipo AA confiera una susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad ya que la frecuencia de dicho polimorfismo es similar en los grupos de pacientes y controles y en los casos esporádicos y familiares de EP. Nuestro estudio además muestra una distribución alélica para la α_1 -antiquimotripsina similar a los reportado en blancos de origen americano (Kamboh et al., 1995), siendo esta distribución diferente a la reportada en la población japonesa, lo que probablemente refleja el diferente origen étnico de las poblaciones caucásica y japonesa. Resultados similares a los nuestros han sido reportados en la población alemana, en la que se ha encontrado el alelo A en el 47% de los pacientes con EP y en el 54% de los controles (Grasbon-Frodl y cols., 1999). Un hallazgo interesante en nuestro estudio fue la mayor frecuencia del polimorfismo AA en sujetos menores de 50 años

que en los mayores de esa edad, lo que plantea la posibilidad de que dicho polimorfismo esté involucrado en la susceptibilidad para el desarrollo de otras enfermedades capaces de limitar las expectativas de vida de los individuos portadores. Diversas mutaciones en el gen de la α_1 -antiquimotripsina ha sido descritas en pacientes con patología hepática y pulmonar.

En el **trabajo 2** investigamos si la presencia de un polimorfismo del gen del receptor D2 de la dopamina consistente en la repetición del dinucleótico TG/CA condicionaba una susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad como había sido reportado previamente en la población anglo-francesa. Sin embargo, nosotros no pudimos demostrar dicha asociación en nuestra población, ya que tanto el alelo 3 como el genotipo 3/3 estaba presente en una frecuencia similar en el grupo control y en el grupo con enfermedad de Parkinson. Resultados similares al nuestro han sido descritos en la población japonesa (Nanko y cols. 1994). Tampoco encontramos diferencias significativas al analizar los resultados obtenidos en función de la edad, la presencia o no de historia familiar de EP, el sexo o el subtipo clínico predominante.

2) Mutaciones en el gen de la α -sinucleína y del gen parkin

El descubrimiento de que algunas familias con enfermedad de Parkinson presentaban una mutación en el gen de la α -sinucleína (Polymeropoulos et al., 1997) motivó la realización de los **trabajos 3 y 4**. En

el **trabajo 3** se analizó la posibilidad de que la mutación Ala53Thr estuviese presente en nuestra población. Sin embargo, el estudio realizado en pacientes con EP familiar y/o de inicio precoz (< 50 años) descartó la presencia de dicha mutación en la población analizada.

La mutación Ala53Thr no es la única que se ha descrito en el gen de la α -sinucleína ya que en una familia alemana con enfermedad de Parkinson familiar se ha encontrado una mutación en el exon 3 consistente en la sustitución de una alanina por una prolina (Ala30Pro) (Krüger y cols., 1998). Sin embargo, como los propios autores señalan esta mutación también es una causa rara de la enfermedad ya que no ha sido encontrada en otros casos de EP ni en una larga serie de sujetos controles.

Para descartar la presencia de mutaciones en otras regiones del gen de la α -sinucleína, ampliamos el estudio a otros exones de la región codificante y de la región 5' colindante, donde algunos autores sitúan al promotor de la α -sinucleína (**trabajo 4**). Solamente, en una familia encontramos una sustitución de una guanina (G) por una adenina (A) en la posición 199 (199 G>A). Esta familia se caracterizaba por la presencia de una EP con un patrón de herencia autosómico dominante, pero con una variabilidad en la edad de inicio de la enfermedad, así como la presencia de varios miembros con temblor esencial. Este cambio no fue encontrado en 98 cromosomas de pacientes con EP familiar, lo que sugiere que, a pesar de no comportar una sustitución de aminoácido (valina) y de no segregarse totalmente con la enfermedad, no es posible descartar la posibilidad de que dicho cambio confiera algún tipo de susceptibilidad para desarrollar EP o

temblor esencial en esta familia, aunque lo más probable es que se trate de un polimorfismo raro.

El estudio de la región 5' flanqueante del gen de la α -sinucleína en los casos de EP esporádica y familiar nos permitió identificar un polimorfismo consistente en la inserción de una adenina en la posición -164 (-164insA) que estaba en desequilibrio de ligamiento con el cambio de una citosina por un guanina en la posición -116 (C-116G). Sin embargo este polimorfismo también estaba presente en la población normal en una frecuencia similar a la encontrada en los casos de EP, por lo que podemos excluir que dicho polimorfismo constituya un factor de riesgo para la enfermedad.

Al igual que nuestro estudio, otros estudios han confirmado que las mutaciones de la región codificante de la α -sinucleína son una causa rara de EP. De hecho esta mutación sólo ha sido descrita en una familia italiana y en 11 familias griegas. La delimitación geográfica de la enfermedad sugiere la probable existencia de un ancestro común para las dos poblaciones.

Un estudio clínico-patológico reciente, realizado en una familia australiana de origen griego portadora de la mutación Ala53Thr, ha mostrado características atípicas para una EP (Spira y cols. 2001). La enfermedad se caracterizaba por un síndrome parkinsoniano de inicio a una edad media de 45 años, con buena respuesta a levodopa pero con deterioro cognitivo progresivo y una duración de la enfermedad que variaba entre los 5 y los 16 años. Hallazgos por otra parte muy similares a los reportados en la primera familia en la que se describió la mutación (Golbe y cols. 1990). Sin embargo, algunos miembros de esta nueva familia australiana

presentaban además clínica de hipoventilación central, hipotensión ortostática, mioclonias prominentes e incontinencia urinaria. La anatomía patológica demostró además de la pérdida neuronal de la sustancia negra y el depósito de cuerpos de Lewy en los núcleos pigmentados del tronco, la presencia de cuerpos de Lewy y vacuolización en el lóbulo temporal, así como pérdida neuronal y gliosis en los ganglios basales.

La identificación de deleciones exónicas en el gen parkin en casos de parkinsonismo autosómico recesivo de inicio juvenil (ARJP), nos llevó a la realización del **trabajo 5**. La búsqueda de mutaciones en el gen nos permitió identificar una nueva mutación homocigota en una paciente de origen marroquí. Esta mutación consistía en una deleción de una guanina en el exón 7 en la posición 871 (c.871delG) lo que condicionaba un cambio en la secuencia de aminoácidos con la aparición precoz de un codón de stop en la posición 297 con el consiguiente truncamiento de la proteína. El cuadro parkinsoniano de esta paciente difería del cuadro clínico habitualmente descrito en los casos de ARJP. Aunque la enfermedad se inició con distonía a nivel de las extremidades inferiores, la paciente desarrolló en pocos años un parkinsonismo severo con importante alteración de los reflejos posturales, pero que respondía de una manera espectacular al tratamiento con agonistas dopaminérgicos sin la aparición de discinesias. Todo ello sugiere que el espectro clínico de las mutaciones del gen parkin es más amplio de lo que los estudios clínicos iniciales parecían sugerir. En este sentido se han encontrado mutaciones en el gen Parkin en pacientes que

sobrepasan la edad de inicio media descrita en ARJP y que están más cerca de la edad media de inicio de la EP típica (Abbas y cols., 1999).

Nuestros resultados confirman además **(trabajo 6)** la presencia de mutaciones del gen parkin en nuestra población y ponen de manifiesto la existencia de una variabilidad clínica intra e interfamiliar con inicio a diferentes edades y la presencia de signos clínicos diferentes en cada caso. Sin embargo, lo más destacado de nuestros resultados es la identificación de una mutación predominante en nuestra población a nivel del exón 2 (255delA) ya que ha sido encontrada en 4 familias no relacionadas entre ellas. Esta mutación ha sido previamente descrita en otras familias europeas (Lücking y cols., 2000; Hoenicka y cols., 2000), lo que sugiere que podría tratarse de una mutación prevalente en la población europea. Esto nos hizo estudiar la presencia de la mutación en 200 cromosomas controles, encontrando la mutación en 1 de ellos, lo que indica, mediante la distribución de Hardy-Weinberg, que 1 de cada 40000 individuos podría ser portador homocigoto de la mutación en nuestra población.

3) Comparación entre los casos familiares y esporádicos de EP

La identificación de casos de enfermedad de Parkinson familiar en nuestro ámbito, en un porcentaje similar al descrito en otros estudios (13%) **(trabajo 7)**, refuerza la hipótesis de que la enfermedad, o al menos la susceptibilidad para desarrollarla, podría estar genéticamente determinada en algunos casos. El análisis del árbol genealógico ha permitido identificar

un patrón hereditario compatible con una herencia de tipo autosómico dominante en la mayoría de nuestras familias. Sin embargo, el número de miembros afectados es muy inferior al de miembros sanos en la mayoría de las familias, lo que sugiere que, probablemente, la penetrancia es baja. Algunas de nuestras familias muestran la presencia de varios hermanos afectados con padres sanos, lo que es compatible con una herencia autosómica recesiva o dominante de baja penetrancia.

El análisis de las características clínicas de los casos familiares de enfermedad de Parkinson y los casos esporádicos, como la edad de inicio, el sexo o el grado de discapacidad no mostró diferencias significativas entre ambos grupos. Sin embargo, cuando se analizó el subtipo clínico que presentaban los pacientes, encontramos que la forma predominantemente tremorigena era significativamente más frecuente en los casos familiares (35,48%) que en los esporádicos (16,3%).

Un hallazgo interesante e inesperado en nuestro estudio fue el encontrar una edad de inicio de la enfermedad diferente en los hombres que en las mujeres. La edad de inicio más tardía en las mujeres podría deberse a factores hormonales o ligados al sexo. En este sentido, existen estudios experimentales que sugieren un papel neuroprotector de los estrógenos en la enfermedad de Parkinson (Disshon y Dluzen, 1997; Miller y cols., 1998).

Similar a lo reportado en otros estudios en los que se analiza la edad de comienzo de la enfermedad en padres e hijos, nuestro estudio apoya la existencia de anticipación genética en la EP familiar, es decir, que la enfermedad se manifiesta a una edad más temprana en los hijos que en los

padres. Hasta ahora, el defecto molecular de las enfermedades en las que se ha reportado anticipación genética se caracteriza por un aumento en la repetición de tripletes de bases, sin embargo, en los pocos casos en que se ha demostrado una alteración genética asociada a la EP, el defecto molecular consiste en una mutación puntual, por lo que es difícil explicar el fenómeno de anticipación en base a una amplificación genética del defecto. La presencia de posibles "sesgos" (Maraganore y cols. 1996), como puede ser el hecho de que la información del inicio de la enfermedad sea obtenida de forma retrospectiva a través de los hijos o de que éstos sean capaces de reconocer mejor el inicio de la enfermedad en ellos mismos, ya que tienen la experiencia de la enfermedad en sus padres puede dificultar el análisis de los resultados en una enfermedad que por otra parte suele tener un inicio insidioso.

VI. CONCLUSIONES

Los trabajos en los que se apoya la presente tesis han permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. El polimorfismo AA de la α 1-antitripsina no se asocia a un riesgo aumentado de sufrir la enfermedad de Parkinson en nuestra población.
2. El polimorfismo TG/CA del receptor D2 de la dopamina no confiere un riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson.
3. La mutación Ala53Thr y otras mutaciones de la región codificante del gen de la α -sinucleína se deben considerar una causa muy rara de enfermedad de Parkinson familiar en nuestra población.
4. El cambio 199G>A en el gen de la α -sinucleína encontrado en una de nuestras familias podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de EP o temblor esencial en esta familia, aunque lo más probable es que se trate de un polimorfismo muy poco prevalente.
5. El polimorfismo -165insA asociado al cambio -116C>G en la región 5' flanqueante del gen de la α -sinucleína no confiere una susceptibilidad para el desarrollo de EP.
6. En nuestra población de pacientes con EP de inicio precoz o de herencia

autosómica recesiva se pueden encontrar mutaciones en el gen Parkin.

El espectro clínico asociado a dichas mutaciones es más amplio de lo que inicialmente se creía por los estudios realizados en la población japonesa.

7. La mutación c.255delA del gen parkin es una mutación relativamente prevalente en nuestra población con EP de inicio precoz o con herencia autosómica recesiva.
8. El porcentaje de casos familiares de enfermedad de Parkinson en nuestra población fue del 13%, similar a lo reportado en otros estudios. El análisis del patrón de herencia de la enfermedad es compatible con una herencia de tipo autosómico dominante de baja penetrancia o con un patrón de herencia autosómico recesivo.
9. Los casos familiares no se diferencian de los casos esporádicos ni en la edad de inicio ni en la severidad de la enfermedad, sin embargo, las formas predominantemente tremorígenas son más frecuentes en los casos familiares.
10. En los casos en que hay afectación de padres e hijos, la edad de inicio de la enfermedad en los hijos es más precoz que en los padres, lo que sugiere la posible existencia de un fenómeno de anticipación genética.

VI. BIBLIOGRAFIA

Arawaca S, Saito Y, Murayama S, Mori H. Lewy body in neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 is immunoreactive for α -synuclein. *Neurology* 1998;51:887-889.

Arima K, Ueda K, Sunohara N, Hirai S, Izumiyama Y, Tonzuka-Uehara H, Kawai M. Immunoelectron-microscopic demonstration of NACP/ α -synuclein-epitopes on the filamentous component of Lewy bodies in Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res* 1998;808:93-100

Arima K, Ueda K, Sunohara N, Arakawa K, Hirai S, Nakamura M, Tonzuka-Uehara H, Kawai M. NACP/ α -synuclein immunoreactivity in fibrillary components of neuronal and oligodendroglial cytoplasmic inclusions in the pontine nuclei in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 1998;96:439-44

Armstrong M, Daly AK, Cholerton S, et al. Mutant debrisoquine hydroxylation genes in Parkinson's disease. *Lancet* 1992;339:1017-1018.

Bandmann O; Davis MB; Marsden CD; Harding AE. Sequence of the superoxide dismutase 1 (SOD 1) gene in familial Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;59:90-1.

Bandmann O, Marsden CD, Wood NW. Genetic aspects of Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998;13:203-211.

Barbeau A, Roy M, Cloutier T, Plasse L, Paris S. Environmental and genetic factors in the etiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1986;45:299-306.

Bartholome K; Ludecke B. Mutations in the tyrosine hydroxylase gene cause various forms of L-dopa-responsive dystonia. *Adv Pharmacol* 1998;42:48-9.

Bhatt MH, Elias MA, Mankodi AK. Acute and reversible parkinsonism due to organophosphate pesticide intoxication: five cases. *Neurology* 1999;52:1467-1471.

Beal MF. Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis. *Ann Neurol* 1998;44(3 Suppl 1):S110-4.

Benabid AL, Pollak P, Gervason et al. Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet* 1991;1:403-406.

Bonifati V, Fabrizio E, Vanacore N, De Mari M, Meo G. Familial Parkinson's disease: A clinical genetic analysis. *Can. J. Neurol. Sci.* 1995;22:272-279.

Bordet R; Broly F; Destee A; Libersa C Genetic polymorphism of cytochrome P450 2D6 in idiopathic Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. Clin Neuropharmacol 1994;17:484-8.

Bostantjopoulou S; Kyriazis G; Katsarou Z; Kiosseoglou G; Kazis A; Mentenopoulos G Superoxide dismutase activity in early and advanced Parkinson's disease. Funct Neurol 1997;12:63-8

Brautigam C; Wevers RA; Jansen RJ; Smeitink JA; de Rijk-van Andel JF; Gabreels FJ; Hoffmann GF. Biochemical hallmarks of tyrosine hydroxylase deficiency. Clin Chem 1998;44:1897-904

Burn DJ, Mark MH, Playford ED et al. Parkinson's disease in twins studied with ¹⁸F-Dopa and positron emission tomography. Neurology, 1992;42:1894-1900.

Byth BC, Billingsley GD, Cox DW. Physical and genetic mapping of the serpin gene cluster at 14q32.1: Allelic association and a unique haplotype associated with α_1 -antitrypsin deficiency. Am J Hum Genet 1994;55:126-133.

Calne DB, Snow BJ, Lee C. Criteria for diagnosing Parkinson's disease. Ann Neurol 1992;32(suppl):S125-S127.

Cardellach F; Martí MJ, Fernández-Sola J, Marín C, Hoek JB, Tolosa E,

Urbano-Márquez A. Mitochondrial respiratory chain activity in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *Neurology* 1993;43:2258-2262

Clayton DF, George JM. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci* 1998;21:249-54

Cohen G, Farooqui R, Kesler N. Parkinson disease: a new link between monoamine oxidase and mitochondrial electron flow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4890-4

Costa P; Checkoway H; Levy D; Smith-Weller T; Franklin GM; Swanson PD; Costa LG. Association of a polymorphism in intron 13 of the monoamine oxidase B gene with Parkinson disease. *Am J Med Genet* 1997;74:154-6

Cotzias CG, Van Woert MH, Schiffer LM. Aromatic amino acids and modification of Parkinsonism. *N Engl J Med* 1967;276:374-379.

Damier P; Kastner A; Agid Y; Hirsch EC. Does monoamine oxidase type B play a role in dopaminergic nerve cell death in Parkinson's disease?. *Neurology* 1996;46:1262-9

Davidson WS, Jonas A, Clayton DF, George JM. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J Biol Chem*. 1998;273:9443-9449.

Degl'Innocenti F, Maurello MT, Marini P. A parkinsonian kindred. *Ital J Neurol Sci* 1989;10:307-310.

De Michele G, Filla A, Volpe G, et al. Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: A case-control study in southern Italy. *Mov Disord* 1996;11:17-23.

De Rijk MC, Breteler MMB, Graveland GA et al. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam study. *Neurology*, 1995;45:2143-2146.

Diederich N, Hilger C, Goetz C, Vieregge P, Metz H. Genetic variability of the CYP2D6 gene is not a risk factor for sporadic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1996;50:463-465.

Disshon KA, Dluzen DE. Estrogen as a neuromodulator of MPTP-induced neurotoxicity: effects upon striatal dopamine release. *Brain Res* 1997;764:9-16.

Duvosin R. The genetics of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1993;60:306-315.

Ehringer H, Hornykiewicz O. Verteilung von noradrenalin und dopamin (3-hydroxytyramin) in gehirn des menschen und ihr verhalten bei erkrankungen

des extrapyramidalen systems. *Klin Wochenschr* 1960;38:1236-1239.

Eliezer D, Kutluay E, Bussell R Jr, Browne G. Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J Mol Biol* 2001;307:1061-1073

Eyles JM. James Parkinson (1755-1824). *Nature* 1955;176:580-581.

Ezquerro M, Blesa R, Tolosa E, Ballesta F, Oliva R. α_1 -Antichymotrypsin gene polymorphism and risk for Alzheimer's disease in the Spanish population. *Neurosci Lett* 1998;240:107-109.

Farrer M, Wavrant-De Vrieze F, Crook R, et al. Low frequency of α -synuclein mutations in familial Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998;43:394-397.

Ferrer I. Las α -sinucleinopatías. *Neurologia* 2001;16:163-170.

Forno LS. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:259-272.

Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, et al. Inhibition of mono-amine oxidase B in the brain of smokers. *Nature* 1996;379:733-736.

Gasser T, Wszolek ZK, Trofatter J et al. Genetic linkage studies in autosomal dominant parkinsonism: evaluation on seven candidate genes. *Ann Neurol*

1994;36:387-396.

Gasser T; Muller-Myhsok B; Supala A; Zimmer E; Wieditz G; Wszolek ZK; Vieregge P; Bonifati V; Oertel WH. The CYP2D6B allele is not overrepresented in a population of German patients with idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996;61:518-20

Gearing M, Olson DA, Watts RL, Mirra SS. Progressive supranuclear palsy. Neuropathologic and clinical heterogeneity. *Neurology* 1994;44:1015-1024.

Gelb DJ, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson Disease. *Arch Neurol* 1999;56:33-39.

Gibb WRG, Lees AJ. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:745-52.

Golbe LI, Cody RA, Duvoisin RC. Smoking and Parkinson's disease: search for a dose-response relationship. *Arch Neurol* 1986;43:774-778

Golbe LI, Di Iorio G, Bonavita V, et al. A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1990;27:276-282.

Golbe L, Di Iorio G, Sanges G, et al., Clinical genetic analysis of Parkinson's disease in the Contursi kindred. *Ann Neurol* 1996;40:767-775.

Golbe LI. Positron emission tomography reveals strong genetic influences in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1999;45:557-558.

Golbe LI. Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *Mov Disord* 1999;14:6-9

Goldman SM and Tanner C. Etiology of Parkinson's disease. In *Parkinson's Disease and Movement Disorders*. Jankovic J and Tolosa E (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, 1998;pp133-158.

Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, et al. Occupational exposures to metals as risk factor for Parkinson's disease. *Neurology* 1997;48:650-658.

Gorell JM, Rybicki BJ, Johnson CC, Peterson EL. Smoking and Parkinson's disease. A dose-response relationship. *Neurology* 1999;52:115-119.

Grasbon-Frodl EM, Egesnperger R, Kosel S, Kurger R, Riess O, Mehraein P, Graeber MB. The alpha-1-antichymotripsin A-allele in German Parkinson diseases patients. *J Neural Transm* 1999;106:729-736.

Guridi J, Luquin MR, Herrero MT, Obeso JA. The subthalamic nucleus: a possible target for stereotaxic surgery in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1993;8:421-429

Harhangi BS, Farrer MJ, Lincoln S, Bonifati V, Meo G, De Michele G, Brice A, Durr A, Martinez M, Gasser T, Bereznoi B, Vaughan JR, Wood NW, Hardy J, Oostra BA, Breteler MM. The Ile93Met mutation in the ubiquitin carboxy-terminal-hydrolase-L1 gene is not observed in European cases with familial Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1999;270:1-4

Higuchi S, Muramatsu T, Arai H, Hayashida M, Sasaki H, Trojanowski J. Polymorphisms of dopamine receptor and transporter genes and Parkinson's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1995;10:107-113.

Hirsch EC, Brandel JP, Galle P, et al. Iron and aluminium increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: An X-ray microanalysis. *J Neurochem* 1991;56:446-451

Ho SC, Woo J, Lee CM. Epidemiologic study of Parkinson's disease in Hong Kong. *Neurology* 1989;39:1314-1318.

Ho S, Kapadi A, Ramsden D, Williams A. An allelic association study of monoamine oxidase B in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1995;37:403-405.

Holthoff VA, Vieregge P, Kessler J, et al. Discordant twins with Parkinson's disease: positron emission tomography and early signs of impaired cognitive circuits. *Ann Neurol* 1994;36:176-182.

Hotamisligil GS, Girmen AS, Fink JS, et al. Hereditary variations in monoamine oxidase as a risk factor for Parkinson's disease. *Mov Disord* 1994;9:305-310.

Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181-184.

Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* 1991;350:230-232.

Iwai A, Masliah E, Sundsmo MP, et al. The synaptic protein NACP is abnormally expressed during the progression of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1996;720:230-4.

Janson AM, Fuxe K, Goldstein M. Differential effects of acute and chronic nicotine treatment on MPTP induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons in the black mouse. *Clin Invest* 1992;70:232-238.

Janson AM, Moller A. Chronic nicotine treatment counteracts nigral cell loss induced by a partial mesodiencephalic hemitranssection: an analysis of the total number and mean volume of neurons and glia in substantia nigra of the male rat. *Neuroscience* 1993;57:931-941.

Jiménez-Jiménez FJ, Ortí-Pareja M, Gasalla-González T. Epidemiología, etiología y patogenia de la enfermedad de Parkinson. En Tratado de los Trastornos del Movimiento. Jiménez-Jiménez FJ, Luquin MR y Molina JA (edits). MI&C, Madrid, 1998; pp:223-258.

Johnson W, Hodge S, Duvoisin R. Twin studies and the genetic of Parkinson's disease -a reappraisal. *Mov disord* 1990;5:187-194.

Jones AC; Yamamura Y; Almasy L; Bohlega S; Elibol B; Hubble J; Kuzuhara S; Uchida M; Yanagi T; Weeks DE; Nygaard TG. Autosomal recessive juvenile parkinsonism maps to 6q25.2-q27 in four ethnic groups: detailed genetic mapping of the linked region. *Am J Hum Genet* 1998;63:80-7

Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Haass C. Physiology and pathophysiology of alpha-synuclein. Cell culture and transgenic animal models based on a Parkinson's disease-associated protein. *Ann N Y Acad Sci* 2000;920:33-41

Kamboh MI, Sanghera DK, Ferrell RE, DeKosky ST. APOE*4-associated Alzheimer's disease risk is modified by α_1 -antichymotrypsin polymorphism. *Nature Genet* 1995;10:486-488.

Kawamata H, McLean PJ, Sharma N, Hyman BT. Interaction of alpha-synuclein and synphilin-1: effect of Parkinson's disease-associated mutations. *J Neurochem* 2001;77:929-934.

Kitada T; Asakawa S; Hattori N; Matsumine H; Yamamura Y; Minoshima S; Yokochi M; Mizuno Y; Shimizu N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998;392:605-8

Ko L, Mehta ND, Farrer M, Easson C, Hussey J, Yen S, Hardy J, Yen SH. Sensitization of neuronal cells to oxidative stress with mutated human alpha-synuclein. *J Neurochem* 2000;75:2546-2554

Kösel S, Lücking CB, Egensperger R, Mehraein P, Graeber MB. Mitochondrial NADH dehydrogenase and CYP2D6 genotypes in Lewy-Body parkinsonism. *J. Neurosci. Res.* 1996;44:174-183.

Kronenberg MF, Menzel HJ, Ebersbach G, Wenning GK, Luginger E, Gollner M, Ransmayr G, Utermann G, Poewe W, Kronenberg F. Dopamine D4 receptor polymorphism and idiopathic Parkinson's disease. *Eur J Hum Genet* 1999;7:397-400

Kunugi H; Kawada Y; Hattori M; Ueki A; Otsuka M; Nanko S. Association study of structural mutations of the tyrosine hydroxylase gene with schizophrenia and Parkinson's disease. *Am J Med Genet* 1998;81:131-3

Kurth JH, Kurth MC. Allele frequencies of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease patients (Abstract). *Mov Dis* 1992;7:290.

Kurth MC and Kurth JH. Variant cytochrome P450 CYP2D6 allelic frequencies in Parkinson's disease. *Am J Med Genet* 1993;48:166-8

Kurth JH, Kurth MC, Poduslo SE, Schwankhaus JD. Association of a monoamine oxidase B allele with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1993;33:368-72

Langston JW, Ballard PA, Tetrud JW, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219:979-980.

Larsen NA, Pakkenberg H, Damsgaard E, et al. Distribution of arsenic, manganese, and selenium in the human brain in chronic renal insufficiency, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1981;51:437-446

Lazzarini AM, Myers RH, Zimmerman TR et al. A clinical genetic study of Parkinson's disease: evidence for dominant transmission. *Neurology* 1994;44:499-506.

Le Couteur DG; Leighton PW; McCann SJ; Pond SM. Association of a polymorphism in the dopamine-transporter gene with Parkinson's disease. *Mov Disord* 1997;12:760-3

Leroy E, Boyer R, Auburger G, Leube B, Ulm G, Mezey E, Harta G, Brownstein MJ, Jonnalagada S, Chernova T, Dehejia A, Lavedan C, Gasser T, Steinbach PJ, Wilkinson KD, Polymeropoulos MH. The Ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998;395:451-452.

Li SC, Shoenberg BS, Wang CC, et al. A prevalence survey of Parkinson's disease and other movement disorders in the People's Republic China. *Arch Neurol* 1985;42:655-657.

Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, et al. Effect on parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 1995;345:91-95.

Lippa CF, Fujiwara H, Mann DM, et al. Lewy bodies contain altered alpha-synuclein in brains of many familial Alzheimer's disease patients with mutations in presenilin and amyloid precursor protein genes. *Am J Pathol* 1998;153:1365-70

Lozano AM, Lang AE, Gálvez-Jimenes N, et al. Effect of Gpi pallidotomy on motor function in Parkinson's disease. *Lancet* 1995;346:1383-1387

Lucotte G; Turpin JC; Gerard N; Panserat S; Krishnamoorthy R Mutation frequencies of the cytochrome CYP2D6 gene in Parkinson disease patients and in families. *Am J Med Genet* 1996;67:361-5

Ludecke B, Knappskog PM, Clayton PT, et al. Recessively inherited L-DOPA-responsive parkinsonism in infancy caused by a point mutation (L205P) in the tyrosine hydroxylase gene. *Hum Mol Genet* 1996;5:1023-8

Macrobius AT, Naumann KF. Parkinson, James. In *Dictionary of Scientific Biography*. Gillispie CC edit. Charles Scribner's Sons. New York, 1981:321-323.

Maraganore DM, Harding AE, Marsden CD. A clinical and genetic study of familial Parkinson's disease. *Mov Disord* 1991;6:205-211.

Maraganore DM, Schaid DJ, Rocca WA, Harding AE. Anticipation in familial Parkinson's disease: A reanalysis of 13 United Kingdom kindreds. *Neurology* 1996;17:1512-1517.

Maraganore DM, Farrer MJ, Hadry JA, Lincoln SJ, McDonnell SK, Rocca WA. Case-control study of the ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 gene in Parkinson's disease. *Neurology* 1999;53:1858-1860.

Marder K, Tang MX, Mejia H, et al. Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: A community-based study. *Neurology* 1996;47:155-160.

Marsden CD. Parkinson's disease in twins. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987;50:105-106.

Markopoulou K, Wszolek ZK, Pfeiffer RF. A Greek-American kindred with autosomal dominant, levodopa-responsive parkinsonism and anticipation. *Ann Neurol* 1995;38:373-378.

Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 1988;8:2804-15

Martilla R, Kaprio J, Kostenvuo M, Rinne U. Parkinson's disease in a nationwide twin cohort. *Neurology* 1988;38:1217-1219.

Maruyama S, Ookawa Y, Mori H, et al. Immunocytochemical and ultrastructural study of Lewy body-like hyaline inclusions in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol (Berlin)* 1989;78:143-52.

Matsubara K, Gonda T, Sawada H, Uezono T, Kobayashi Y, Kawamura T, Ohtaki K, Kimura K, Akaike A. Endogenously occurring beta-carboline induces parkinsonism in nonprimate animals: a possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's disease. *J Neurochem* 1998;70:727-735

Matsumine H, Saito M, Shimoda-Matsubayashi S, et al. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet* 1997;60:588-96

Matsumine H, Yamamura Y, Kobayashi T, et al. Early onset parkinsonism with diurnal fluctuation maps to a locus for juvenile parkinsonism.

Neurology 1998;50:1340-5

Masliah E, Iwai A, Mallory M, et al. Altered presynaptic protein NACP is associated with plaque formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. Am J Pathol 1996;148:201-10

Menegon A, Board PG, Blackburn AC, Mellick GD, Le Couteur DG
Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. Lancet 1998;352:1344-1346.

Miller DB, Ali SF, O'Callaghan JP, Laws SC. The impact of gender and estrogen on striatal dopaminergic neurotoxicity. Ann N Y Acad Sci 1988;844:153-165.

Mjönes H. Paralysis agitans. A clinical genetic study. Acta Neurol Scand 1949;25(suppl 54):1-195

Morens DM, Grandinetti A, Reed D, et al. Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue? Neurology 1995;45:1041-1051

Morgante L, Rocca WA, Di Rosa AE, et al. Prevalence of Parkinson's disease and other types of parkinsonism: A door-to-door survey in three Sicilian municipalities. *Neurology* 1992;42:1901-1907.

Mori H, Kondo T, Yokochi M, et al. Pathologic and biochemical studies of juvenile parkinsonism linked to chromosome 6q. *Neurology* 1998;51:890-2

Morimoto Y, Murayama N, Kuwano A, et al. Association analysis of a polymorphism of the monoamine oxidase B gene with Parkinson's disease in a Japanese population. *Am J Med Genet* 1995;60:570-2

Nagatsu T. Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology. *Essays Biochem* 1995;30:15-35

Nagatsu T. Isoquinoline neurotoxins in the brain and Parkinson's disease. *Neurosci Res* 1997;29:99-111

Nanko S, Ueki A, Hattori M, et al. No allelic association between Parkinson's disease and dopamine D2, D3, and D4 receptor gene polymorphisms. *Am J Med Genet* 1994;54:361-4.

Nanko S, Ueki A, Hattori M. No association between Parkinson's disease and monoamine oxidase A and B gene polymorphisms. *Neurosci Lett* 1996;204:125-7

Nishiyama K, Murayama S, Shimizu J, et al. Cu/Zn superoxide dismutase-like immunoreactivity is present in Lewy bodies from Parkinson disease: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)* 1995;89:471-4.

Nusbaum RL. Putting the Parkin into Parkinson's. *Nature* 1998, 392:544-5.

Okochi M, Walter J, Koyama A, Nakjo S, Baba M, Iwatsubo T et al. Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated α -synuclein. *J Biol Chem* 2000;275:390-397.

Ostrerova N, Petrucelli L, Farrer M, Mehta N, Choi P, Hardy J, Wolozin. Alpha-synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins. *J Neurosci.* 1999;19:5782-5791.

Parboosingh JS; Rousseau M; Rogan F; Amit Z; Chertkow H; Johnson WG; Manganaro F; Schipper HN, Curran TJ, Stoessl J, et al. Absence of mutations in superoxide dismutase and catalase genes in patients with Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1995;52:1160-3

Parkinson Study Group. Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients not requiring levodopa. *Ann Neurol* 1996;39:37-45.

Patten BM. Parkinson's disease. In *The Cambridge World History of Human Disease*. Kiple KF, ed. Cambridge University Press, USA, 1993:914-8.

Payami H, Larsen K, Bernard S, Nutt J. Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. *Ann Neurol* 1994;36:659-661.

Planté Bordeneuve V, Taussig D, Thomas F, Ziegler M, Said G. A clinical and genetic study of familial cases of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1995;133:164-172

Planté-Bordeneuve V, Davis MB, Maraganore DM et al. Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism in familial Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg and Psychiatry* 1994a;57:911-913.

Planté-Bordeneuve V; Davis MB; Maraganore DM; Marsden CD; Harding AE. Tyrosine hydroxylase polymorphism in familial and sporadic Parkinson's disease. *Mov Disord* 1994b;9:337-9

Plante-Bordeneuve V; Taussig D; Thomas F; Said G; Wood NW; Marsden CD; Harding AE. Evaluation of four candidate genes encoding proteins of the dopamine pathway in familial and sporadic Parkinson's disease: evidence for association of a DRD2 allele. *Neurology* 1997;48:1589-93

Piccini P, Morrish PK, Turjanski N, et al. Dopaminergic function in familial

Parkinson's disease: a clinical and ¹⁸F-dopa study. *Ann Neurol* 1997;41:222-229

Poewe W, Gerstenbrand F, Ransmayr G, Ploer S. Premorbid personality of Parkinson patients. *J Neural Transm Suppl* 1983;19:215-224.

Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science* 1996;274:1197-1199.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-2047.

Poskander DC, Schwab RS. Cohort analysis of Parkinson's disease: evidence for a single etiology related to subclinical infection about 1920. *J Chronic Dis* 1963;16:961-973

Prasad C, Ikegami H, Shimizu I, Onaivi ES. Chronic nicotine intake decelerates aging of nigrostriatal dopaminergic neurons. *Life Sci* 1994;54:1169-1184.

Przedborski S, Jackson-Lewis V, Muthane U et al. Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity. *Ann*

Neurol 1993;34:715-723.

Quinn NP, Rosor MN, Marsden CD. Dementia and Parkinson's disease. Pathological and neurochemical considerations. Br Med Bull 1986; 42:86-90.

Radunovic A; Porto WG; Zeman S; Leigh PN. Increased mitochondrial superoxide dismutase activity in Parkinson's disease but not amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. Neurosci Lett 1997;239:105-8.

Rajput AH, Uitti RJ, Stern W, Lavery W, O'Donnell K, O'Donnell D, Yuen WK, Dua A. Geography, drinking water chemistry, pesticides and herbicides and the etiology of Parkinson's disease. Can J Neurol Sci 1987;14(3 Suppl):414-418

Ricketts MH, Hamer RM, Manowitz P, et al. Association of long variants of the dopamine D4 receptor exon 3 repeat polymorphism with Parkinson's disease. Clin Genet 1998;54:33-8.

Riederer P, Konradi C, Hebenstreit G, Youdim M. Neurochemical perspectives to the function of monoamine oxidase. Acta Neurol Scand 1989;126:41-45.

Riederer P, Sofic E, Rausch WD, et al. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. J Neurochem 1989;52:515-520

Riedl AG, Watts PM, Jenner P, Marsden CD. P450 enzymes and Parkinson's disease: the story so far. *Mov Disord*, 1998;13:212-220.

Rozemuller JM, Abbink JJ, Kamp AM, et al. Distribution pattern and functional state of α_1 -antichymotrypsin in plaques and vascular amyloid in Alzheimer's disease. A immunohistochemical study with monoclonal antibodies against native and inactivated alpha 1-antichymotrypsin. *Acta Neuropathol Berl*, 1991;82:200-207

Saito M, Matsumine H, Tanaka H, et al.. Refinement of the gene locus for autosomal recessive juvenile parkinsonism (AR-JP) on chromosome 6q25.2-27 and identification of markers exhibiting linkage disequilibrium. *J Hum Genet* 1998;43:22-31

Sandy MS, Armstron M, Tanner CM et al. CYP2D6 allelic frequencies in young-onset Parkinson's disease. *Neurology* 1996;47:225-230.

Sawle GV, Wroe SJ, Lees AJ, Brooks DJ, Frackowiak RSJ. The identification of presymptomatic parkinsonism: clinical and ^{18}F -Dopa positron emission tomography studies in an Irish kindred. *Ann Neurol* 1992;32:609-617.

Schoenberg BS, Osuntokun BO, Adeuja AOG, et al. Comparison of the prevalence of Parkinson's disease in black populations in the rural US and in

the rural Nigeria: door-to-door community studies. *Neurology* 1988;38:645-646

Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, et al. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: A case-control study in Germany. *Neurology* 1996;46:1275-1284

Semchuk KM, Love EJ, Lee RG. Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology* 1992;42:1328-1335.

Semchuk K, Love E, Lee R. Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology* 1993;43:1173-1180.

Sendtner M, Toyka KV. Neurotrophic factors: biology and possible therapeutic use in neurodegenerative disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 1995; 54:S32-S34.

Senanayake N, Sanmuganathan PS. Extrapyrarnidal manifestations complicating organophosphorus insecticide poisoning. *Hum Exp Toxicol* 1995;14:600-604.

Schapira AHV, Mann VM, Cooper JM et al. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ₁ reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1990;55:2142-2145

Shimizu N, Asakawa S, Minoshima S, Kitada T, Hattori N, Matsumine H, Yokochi M, Yamamura Y, Mizuno Y. Parkin as a pathogenic gene for autosomal recessive juvenile. *J Neural Transm* 2000, 58(suppl):19-30

Shimura H, Hattori N, Kubo S, Yoshikawa M, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Minoshima S, Yamamura Y, Shimizu N, Mizuno Y. Immunohistochemical and subcellular localization of parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann Neurol* 1999; 45:668-672.

Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 2000; 25:302-305.

Shults CW, Haas RH, Passov D, Beal MF. Coenzyme Q₁₀ levels correlate with the activities of complexes I and II/III in mitochondria from parkinsonian and nonparkinsonian subjects. *Ann Neurol* 1997;42:261-264

Smith CAD et al. Association between the CYP2D6-debrisoquine hydroxylase polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Lancet* 1992;339:1375-1377.

Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, et al. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;338:839-840.

Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, et al. Alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6469-6473.

Spira PJ, Sharpe DM, Halliday G, Cavanagh J, Nicholson GA. Clinical and pathological features of a parkinsonian syndrome in a family with an Ala53Thr α -synuclein mutation. *Ann Neurol* 2001;49:313-319.

Steiger MJ; Lledo P; Quinn NP; Marsden CD; Turner P; Jenner PG. Debrisoquine hydroxylation in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 1992;86:159-64.

Takahashi H, Ohama E, Suzuki S, Horikawa Y, Ishikawa A, Morita T, Tsuji S, et al. Familial juvenile parkinsonism: clinical and pathologic study in a family. *Neurology* 1994;44:437-441.

Tanaka Y, Engelender S, Igarashi S, Rao RK, Wanner T, Tanzi RE, Sawa A, Dawson V, Dawson TM, Ross CA. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. *Hum Mol Genet* 2001;10:919-926

Tanner CM, Chen B, Wang W, et al. Environmental factors and Parkinson's disease: a case-control study in China. *Neurology* 1989;39:660-664.

Tanner CM, Ottman R, Goldman SM, et al. Parkinson disease in twins. An etiologic study. *JAMA* 1999;281:341-346.

Tassin J, Durr A, de Broucker T, et al. Chromosome 6-linked autosomal recessive early-onset Parkinsonism: linkage in European and Algerian families, extension of the clinical spectrum, and evidence of a small homozygous deletion in one family. The French Parkinson's Disease Genetics Study Group, and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Am J Hum Genet* 1998;63:88-94

Taylor CA, Saint-Hilaire MH, Cupples LA, Thomas CA, Burchard AE, Feldman RG, Myers RH. Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study. *Am J Med Genet* 1999;88:742-749.

Thibaut F, Ribeyre JM, Dourmap N, et al. Association of DNA polymorphism in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene with disturbances of the catecholaminergic system in schizophrenia. *Schizophr Res* 1997;23:259-64

Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Otero D y cols. Molecular cloning of a novel component of amyloid in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11282-11286.

Valente EM, Bentivoglio AR, Dixon PH, Ferraris A, Ialongo T, Frontali M, Albanese A, Wood NW. Localization of a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, PARK6, on human chromosome 1p35-p36. *Am J*

Hum Genet 2001;68:895-900.

Valdeoriola F, Molinuevo JL, Valls-Solé J. Bilateral subthalamic stimulation and parkinsonian gait. *Adv Neurol* 2001;87:289-299.

Van den Heuvel LP, Luiten B, Smeitink JA, et al. A common point mutation in the tyrosine hydroxylase gene in autosomal recessive L-DOPA-responsive dystonia in the Dutch population. *Hum Genet* 1998;102:644-646

Vaughan JR, Farrer MJ, Wszolek ZK, et al. Sequencing of the α -synuclein gene in a large series of cases of familial Parkinson's disease fails to reveal any further mutations. *Hum Mol Genet* 1998;7:751-753.

Vierregge P, Schiffke K, Friedrich H, Müller B, Ludin H. Parkinson's disease in twins. *Neurology* 1992;42:1453-1461.

Wan DC, Law LK, Ip DT, Cheung WT, Ho WK, Tsim KW, Kay R, Woo J, Pang CP. Lack of allelic association of dopamine D4 receptor gene polymorphisms with Parkinson's disease in a Chinese population. *Mov Disord* 1999;14:225-229.

Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H. Alpha-synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 1998;249:180-182.

Wang WW, Khajavi M, Patel BJ et al. The G209A mutation in the α -synuclein gene is not detected in familial cases of Parkinson's disease in non-Greek and/or Italian populations. *Arch Neurol* 1998;55:1521-1523.

Wang J, Liu ZL, Chen B. Association study of dopamine D2, D3 receptor gene polymorphisms with motor fluctuations in PD. *Neurology* 2001;56:1757-9

Ward C, Duvoisin R, Ince S, Nutt J, Eldridge R, Calne D. Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of quadruplets. *Neurology* 1983;33:815-824.

Waters CH, Miller CA. Autosomal dominant Lewy body parkinsonism in a four-generation family. *Ann Neurol* 1994;35:59-64.

Wintermeyer P, Kruger R, Kuhn W, Muller T, Voitalla D, Berg D, Becker G, Leroy E, Polymeropoulos M, Berger K, Przuntek H, Schols L, Epplen JT, Riess O. Mutation analysis and association studies of the UCHL1 gene in German Parkinson's disease patients. *Neuroreport* 2000;11:2079-2082.

Wong GF, Gray CS, Hassanein RS, Koller WC. Environmental risk factors in siblings with Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1991;48: 287-289.

Wong KT, Allen IV, McQuaid S, McConnell R. An immunohistochemical

study of neurofibrillary tangle formation in post-encephalitic Parkinsonism. *Clin Neuropathol* 1996;15:22-5.

Yamamoto M, Kondo I, Ogawa N, Asanuma M, Yamashita Y, Mizuno Y. Genetic association between susceptibility to Parkinson's disease and α_1 -antichymotrypsin polymorphism. *Brain Res* 1997;759:153-155.

Yamamura Y, Arihiro K, Kohriyama T, Nakamura S. Early-onset parkinsonism with diurnal fluctuation: clinical and pathological studies. *Clin Neurol* 1993;33:491-496.

Yamamura Y, Hattori N, Matsumine H, Kuzuhara S, Mizuno Y. Autosomal recessive early-onset parkinsonism with diurnal fluctuation: clinicopathologic characteristics and molecular genetic identification. *Brain Dev* 2000;22 Suppl 1:87-91.

Yoritaka A, Hattori N, Mori H, et al. Kato K. An immunohistochemical study on manganese superoxide dismutase in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1997;148:181-6

VIII. ABREVIATURAS

ACT	Alfa-1-antiquimotripsina
Ala	Alanina
ARJP	Parkinsonismo juvenil autosómico recesivo
AVC	Accidente vascular cerebral
CK-II	Casinkinasa II
CYP2D6	Gen de la debrisoquina hidroxilasa
DRD2	Receptor D2 de la dopamina
EMG	Electromiografía
EP	Enfermedad de Parkinson
NAC	Componente no beta-amiloide
NAT2	N-acetiltransferasa 2
MAO	Monoaminoxidasa
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pro	Prolina
SOD1	Cobre-zinc superóxido dismutasa
SSCP	Single strand conformation polymorphism
TAC	Tomografía axial computerizada
TH	Tirosina hidroxilasa
Thr	Treonina
UCH-L1	Hidrolasa carboxiterminal de la ubiquitina L1
UPDRS	Escala unificada de la enfermedad de Parkinson